



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
Y BIOQUÍMICAS**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO-BIOQUÍMICAS  
ÁREA DE FITOQUÍMICA**

**Caracterización del contenido de proteínas y de  
la actividad proteolítica del látex proveniente de  
especies de *Ficus* spp., nativas de Bolivia y de  
Perú**

**ELABORADO POR:**

**JUAN YUJRA CÁRDENAS**

**TUTOR:**

**ALBERTO GIMÉNEZ TURBA Ph.D.**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2011**

## DEDICATORIA

*El presente trabajo está dedicado mi padre Juan, a mi madre Leandra, y a mis hermanos Marcelo, Daniel, Alejandra y Leonardo. Gracias a mi familia por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, ahora y siempre.*

*También a la memoria de mi querido hermano mayor Juan, descansa en paz, Juani.*

## AGRADECIMIENTOS

A continuación hago llegar mis agradecimientos a las siguientes personas:

- A Dios por la maravillosa experiencia de la vida con sus bajas pero también con sus altas.
- A mi padre Juan la cabeza de mi hogar y a mi madre Leandra el corazón del mismo, por ser mis modelos a seguir de dedicación, esfuerzo, lucha y sacrificio, día a día sin desfallecer ni claudicar, además de haberme apoyado y amado siempre durante toda mi vida. Todo lo que soy se los debo a ustedes. Los amo Pa y Ma.
- A mis hermanos Marcelo (Chuletín, siempre confundido como el hermano mayor por su madurez y formalidad), Daniel (Dani, inteligente, entusiasta, y amigüero), Alejandra (Ale, mi brujita y mi princesita) y Leonardo (Leo, mi caballero). Mis compañeros y mejores amigos que contribuyeron a mi desarrollo personal y académico, a mi lado y a la distancia. Gracias por aguantarme chicos, en serio los amo.
- A Daniela Estrada por enseñarme tantas cosas, en especial el significado de las palabras cariño y ternura. Por los hermosos momentos que compartimos juntos. Gracias por ser la mujer de mi vida. Te Amo Daniela.
- Al doctor Alberto Giménez por su constante apoyo y guía, las oportunidades, las charlas, los conocimientos, los consejos y las vivencias compartidas. Muchas gracias doctor Alberto por haber sido un segundo padre para mí.
- A mi mejor amigo Efraín Salamanca, por todo el apoyo brindado en la elaboración de este trabajo, así como por su amistad y constante guía desde la primera clase de anatomía.
- A Danitza Romero por su apoyo y amistad.
- A mis hermanos y hermanas: Patricia, Benjo, Mónica y Rolo, además de mis tías Cristina, Arminda y Erlinda, mi segunda familia, por haberme querido como su hermano y como su hijo respectivamente.
- A mi tío Osvaldo Cárdenas, por haber sido mi inspiración y enseñarme que los sueños se alcanzan con trabajo, esfuerzo y dedicación.
- A la memoria de mi hermano Juani, que descansa en paz. Gracias por tu apoyo, generosidad y gran corazón, además de abrirme las puertas de tu hogar y hacerme parte de tu familia, tu esposa Roxana, y tus hijos Huáscar y Abraham.
- A mi cuñada Shirley y a la pequeña Laurita, por los consejos y la alegría que me brindan, respectivamente.
- Al doctor David Gutiérrez (Dr. David Don Oso) por sus consejos, y por los buenos momentos compartidos.
- A la doctora Esther Flores por su disciplina, apoyo y comprensión. Muchas gracias doctora Ninoska.
- A Crispín Paredes (papá Crispín), por su amistad, guía, apoyo y comprensión.
- A los guardias de la facultad, en especial al suboficial Melendrez, por su infinita comprensión y paciencia, al permitirme quedarme hasta altas horas de la noche.
- A mi “*Alma Máter*”: la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés. Mi casa superior de estudios que me formó académica y personalmente, a la cual le debo mucho y siempre la tendré presente en mi vida, recordándola con mucho respeto y cariño.
- Y finalmente sin un orden en particular a las personas que han sido y son parte de mi vida: Rossío Rodríguez, Patricia Salazar, Yáscara Dávila, Ricardo Grados, Aneliz Ninahuanca, Julia Molina, Christian Espinal, Lidia Mamani, Lizeth Vargas, Willford Rodríguez, Cinthia Mamani, Dennis Santander, Juan Pablo Apaza, Annette Fernández, Wendy Aliaga, Milton Flores, Daniela Luna, Karina Bustillos, Mario Chávez, Fabiola Pacheco, Katherine Aruquipa, Óscar Cárdenas, Carolina Pacheco, Joanna Tarifa, Iván Limachi, Vianca Pacheco, Rosalia Limachi, Álex Aguilar, Vanesa Apaza, Micay Torrez, Iván Valencia, Fabiola Llanos, Boris Espinoza... Y a todas las personas que no recuerdo pero que las tengo presentes... Gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <i>Ficus</i> spp. ....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Composición del látex .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Ficina .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4. Estructura bioquímica de las cisteín-proteinasas vegetales .....</b>	<b>4</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Objetivo General .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>7</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1. Recolección del látex .....</b>	<b>7</b>
<b>4.2. Procesamiento del látex .....</b>	<b>10</b>
<b>4.3. Determinación del contenido de proteínas .....</b>	<b>11</b>
<b>4.3.1. Metodo de Lowry .....</b>	<b>12</b>
<b>4.3.1.1. Preparación del reactivo de Lowry .....</b>	<b>13</b>
<b>4.3.1.2. Mecanismo de la reacción de Lowry .....</b>	<b>14</b>
<b>4.3.1.3. Procedimiento en la determinación de Lowry .....</b>	<b>14</b>
<b>4.3.2. Método de Biuret .....</b>	<b>15</b>
<b>4.3.2.1. Composición del reactivo de Biuret .....</b>	<b>15</b>
<b>4.3.2.2. Mecanismo de la reacción de Biuret .....</b>	<b>15</b>
<b>4.3.2.3. Procedimiento en la determinación de Biuret .....</b>	<b>16</b>
<b>4.4. Actividad coagulante sobre leche en polvo .....</b>	<b>16</b>
<b>4.5. Cuantificación de la actividad proteolítica .....</b>	<b>17</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
<b>5.1. Procesamiento del látex .....</b>	<b>18</b>
<b>5.2. Determinación de la cantidad de proteínas totales .....</b>	<b>18</b>

	<b>Página</b>
<b>5.2.1. Método de Lowry .....</b>	<b>18</b>
<b>5.2.2. Método de Biuret .....</b>	<b>21</b>
<b>5.3. Actividad coagulante sobre leche en polvo .....</b>	<b>23</b>
<b>5.4. Cuantificación de la actividad proteolítica mediante el método de la azocaseína.....</b>	<b>24</b>
<b>5.5. Cuantificación de la actividad proteolítica específica .....</b>	<b>26</b>
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>30</b>
<b>6.1. Conclusión general .....</b>	<b>30</b>
<b>6.2. Conclusiones específicas .....</b>	<b>30</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>31</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>36</b>

## ÍNDICE DE LAS FIGURAS

		Página
Figura 1.	Dibujo de <i>Ficus insipida</i> Willd. spp. <i>insipida</i> (Moraceae) .....	1
Figura 2.	Estructura de las cisteína-proteasas .....	5
Figura 3.	Incisión realizada sobre el árbol del bibosi blanco ( <i>Ficus</i> spp.) .....	9
Figura 4.	Recolección del látex del árbol del bibosi blanco ( <i>Ficus</i> spp.) en un recipiente de polietileno .....	9
Figura 5.	Centrífuga refrigerada mult rotor modelo 2–16PK, marca <i>sigma</i> <sup>®</sup> .....	11
Figura 6.	Lector en placas <i>Epoc</i> modelo <i>ELx800</i> de la marca <i>Biotek</i> <sup>®</sup> .....	12
Figura 7.	Mecanismo de la reacción de Lowry .....	14
Figura 8.	Mecanismo de reacción de Biuret .....	16
Figura 9.	Curva de calibración con B.S.A. para la determinación de proteínas totales (método de Lowry) .....	19
Figura 10.	Determinación de proteínas totales (método de Lowry) .....	20
Figura 11.	Curva de calibración con B.S.A. para la determinación de proteínas totales (método de Biuret) .....	21
Figura 12.	Determinación de proteínas totales (método de Biuret) .....	22
Figura 13.	Tiempo de coagulación de la leche .....	23
Figura 14.	Curva de calibración con la ficina para la determinación de la actividad proteolítica (método de la azocaseína) .....	25
Figura 15.	Determinación de la actividad proteolítica de las muestras de <i>Ficus</i> spp. (método de la azocaseína) .....	26
Figura 16.	Actividad específica de las muestras de <i>Ficus</i> spp. ....	27

## ÍNDICE DE LAS TABLAS

		Página
Tabla 1.	Cisteína-Proteinasas vegetales y sus fuentes .....	3
Tabla 2.	Detalle de identificación para las muestras de <i>Ficus</i> spp. que fueron empleadas .....	8
Tabla 3.	Densidades ópticas para las diferentes concentraciones de B.S.A. mediante el método de Lowry .....	19
Tabla 4.	Determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Lowry .....	20
Tabla 5.	Densidades ópticas para las diferentes concentraciones de B.S.A. mediante el método de Biuret .....	21
Tabla 6.	Determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Biuret .....	22
Tabla 7.	Tiempo de la actividad coagulante sobre la leche .....	23
Tabla 8.	Densidades ópticas para las diferentes concentraciones de ficina mediante el método de la azocaseína para la cuantificación de la actividad proteolítica .....	24
Tabla 9.	Cuantificación de la actividad proteolítica determinada por el método de la azocaseína .....	25
Tabla 10.	Actividad específica de las muestras de <i>Ficus</i> spp. ....	27

## ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Tabla Suplementaria 1.	Detalle de las densidades ópticas para las diferentes concentraciones de B.S.A. mediante el método de Lowry ...	36
Tabla Suplementaria 2.	Detalle de la determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Lowry .....	36
Tabla Suplementaria 3.	Detalle de las densidades ópticas para las diferentes concentraciones de B.S.A. mediante el método de Biuret ...	37
Tabla Suplementaria 4.	Determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Biuret .....	39
Tabla suplementaria 5.	Tiempo de la actividad coagulante sobre la leche .....	41
Tabla Suplementaria 6.	Detalle de las densidades ópticas para las diferentes concentraciones de ficina mediante el método de la azocaseína para la cuantificación de la actividad proteolítica .....	41
Tabla Suplementaria 7.	Detalle de la cuantificación de la actividad proteolítica determinada por el método de la azocaseína .....	42
Tabla suplementaria 8.	Actividad proteolítica específica de <i>Ficus</i> spp. ....	44



## RESUMEN

El género *Ficus* pertenece a una familia de plantas cuyo látex posee una elevada actividad proteolítica la cual se atribuye principalmente a una cisteína-proteasa con múltiples isoformas, denominada ficina. Dicha enzima constituye un firme candidato para el tratamiento de infecciones producidas por nemátodos gastrointestinales en los seres humanos, en base al uso tradicional de pueblos de la amazonía boliviana como vermífugo, pero que necesita ser validado por el método científico.

Con este propósito, en el presente trabajo se evaluó de manera inicial el contenido de proteínas así como de la actividad proteolítica en diversas muestras del látex obtenido a partir de especies de *Ficus* spp., obtenidas en tres diferentes estaciones (primavera, verano y otoño australes) y provenientes de dos distintas naciones (Bolivia y Perú).

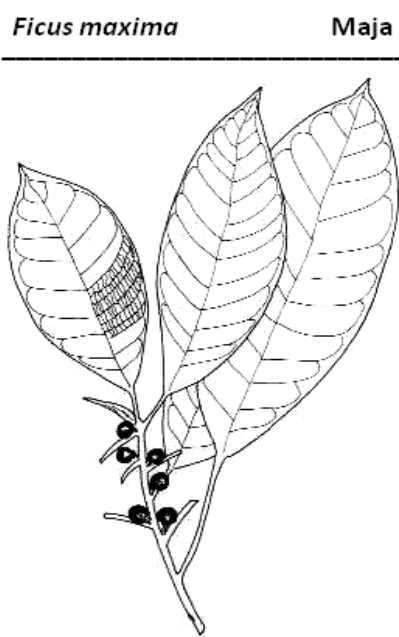
Se determinó que el contenido de proteínas totales presentes en las fases acuosas obtenidas a partir del látex de *Ficus* spp. de especies nativas de Bolivia y de Perú, siendo de: 178,57 mg/ml, 175,18 mg/ml, y 177,55 mg/ml para las muestras *BPLN09*, *BPLN10*, *BPLD10*, respectivamente; y de 134,64 mg/ml y 168,52 mg/ml, para las muestras *PLoN09* y *PLoA10*, respectivamente. También se determinaron los tiempos de coagulación de la leche para las mismas muestras en: 55,67 segundos; 57,48 segundos; y 56,50 segundos 55,67 segundos; para las muestras *BPLN09*, *BPLN10* y *BPLD10*, respectivamente; y de 50,90 segundos y de 76,09 segundos para las muestras *PLoN09* y *PLoA10*, también respectivamente. Finalmente se midió su actividad proteolítica determinándose en: 9,53 U/ml; 10,82 U/ml; y de 10,01 U/ml; 8,49 U/ml y de 6,55 U/ml, para las muestras *BPLN09*, *BPLN10* y *BPLD10*, *PLoN09* y *PLoA10*, respectivamente. De manera adicional, se determinaron las actividades específicas de 0,0533 U/mg para *BLPN09*; 0,0618 U/mg para *BLPN10*; 0,0563 U/mg para *BLPD10*; 0,0631 U/mg para *PLoN09*, y de 0,0389 U/mg para *PLoA10*.

Los diferentes ensayos empleados deben ser optimizados, a fin de que las propiedades de este tipo de extractos sean evaluadas en función a sus componentes cualitativos y cuantitativos, lo cual nos permitirá validar a dichos productos naturales y emplearlos de acuerdo a lo indicado por su uso tradicional, sin efectos secundarios indeseados.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Ficus* spp.

El género *Ficus* pertenece a la familia *Moraceae* y al orden Urticales. La familia *Moraceae* está compuesta de árboles y arbustos que característicamente tienen un jugo lechoso. El jugo lechoso de plantas de al menos 5 géneros contiene una elevada actividad proteolítica. Éstos son *Maclura* (osage naranja: palo de arco), *Morua* (morera), *Brosimum* (nuez de pan), *Broutssonetia* (mora de papel) y *Ficus* (varias especies de higueras) (Williams *et al.*, 1968).



**Figura 1.** Dibujo de *Ficus insipida* Willd. Spp. *insipida* (Moraceae). (Tomado de Tacana: *Ecuánasha aquí, ecuanasha id'rene cuana, me schanapaque*, 1999).

*Ficus* incluye a uno de los géneros más grandes de plantas florescentes con cerca de 750 especies nombradas, las mismas están ampliamente difundidas en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo. Pertenecen a este género diversas formas tales como el higo comestible común (*F. carica*), la higuera sicómora (*F. sycomorus*), la higuera de Bengala (*F. indica* y *F. benghalensis*), varias higueras estrangulantes (varias especies que incluyen a *F. bonplandiana* y *F. padifolia*, árbol de caucho (*F. elastica*) y la higuera trepadora (*F.*

*repens*) (Lansky y Paavilainen, 2011). Quizás las únicas características que unifican a este género (que incluye a vides, arbustos, y árboles), es el látex lechoso y la producción de frutos, los cuales difieren marcadamente en el tamaño, la forma, el color, la localización de la planta, y la frecuencia de aparición entre las diferentes especies (Kraus; 1930).

Otro rasgo común de este género es la elevada actividad proteolítica del látex. Previamente se ha demostrado que el látex de *F. glabrata* y *F. carica* tiene una actividad proteolítica muy alta (Williams *et al.*, 1969).

En Bolivia se tiene documentada la actividad proteolítica de especies de *Ficus* reconocidas como *Ficus insipida* Willd. Spp. *insipida* (Moraceae) y *Ficus maxima* Miller (Moraceae), las cuales son conocidas genéricamente como *Maja* en el dialecto del pueblo tacana (FONAMA–IRD–UMSA–CIPTA, 1999). Las mismas se diferencian por el color de sus cortezas: *Maja dhahua* o *dheve* (corteza verde o negra), *Maja dhere* (corteza roja o colorada) y *Maja pasha* (Corteza blanca).

Los estudios comparativos realizados indicaron que si bien las condiciones de uniformidad en el cultivo de la planta y la recolección del látex contribuyen a que el contenido de la proteína activa sea mayor, el contenido de enzima de la savia de la *Ficus* nativa crecida en condiciones silvestres es bastante alto (Williams *et al.*, 1968).

## **1.2. Composición del látex**

El látex de *F. glabrata* es un líquido blanco y viscoso que contiene 7–25% de sólidos. Después de la filtración para quitar ceras y resinas el contenido de sólidos es de 4–9%. El látex de los árboles de higo contienen lisozimas, quitinasa y peroxidasa, enzimas que junto con la ficina podrían contribuir a proteger a los árboles de los parásitos (Gaughran, 1976).

Se ha visto que esteroides con actividad biológica están presentes en el látex de *Ficus carica* (Lansky y Paavilainen, 2011). El alcaloide doliarina es uno de los principios activos presente en la planta. Además, se ha estudiado a la hexosaminidasa, una enzima lisosómica

involucrada en el catabolismo de las glucoproteínas (Orlacchio *et al.*, 1985). Adicionalmente se han reportado a los terpenos, lavandulol, lupeol, fillantol y eloxantina en el látex de *F. glabrata* (López y de Kiyán, 1974). Se sugiere que la eloxantina también es responsable de la acción vermífuga (Hansson *et al.*, 1986). Sin embargo, el componente principal es el complejo proteolítico enzimático, llamado ficina o ficaina (Gaughran, 1976).

### 1.3. Ficina

Inicialmente, Robbins reportó que el principio proteolítico activo de *Ficus*, nombrado ficina (Robbins, 1930). Se ha documentado una actividad proteolítica apreciable de sólo 13 de 46 especies de *Ficus*. No existe una correlación entre la actividad proteolítica y el contenido de proteína presente en el látex (Williams *et al.*, 1968).

Tabla 1. Cisteína-Proteinasas vegetales y sus fuentes			
Especies vegetales (nombre común)	Enzima	pH óptimo	Estabilidad en medio ácido a:
<i>Carica papaya</i> (papaya)	Papaina	4-10	pH = 4
	Quimimopapaína	3-10	pH > 1.2
	Caricaina	3-10	pH = 4
	Glicil-endopeptidasa	3-10	pH = 3
<i>Ficus carica</i> (higo del mediterráneo)	Ficina	4-8.5	pH = 4
<i>Ficus glabrata</i>	Ficaina	4-8.5	pH = 3.3
<i>Ananas comosus</i> (piña)	Bromelina del tallo	5.5-8	ND
	Bromelina del fruto	5.5-8	ND
	Ananaina	5.5-8	ND
	Comosaina	5.5-8	ND
<i>Actinidia chinensis</i> (fruto del kiwi)	Actinidaina	4-10	ND
<i>Calotropis gigantea</i> (planta de madar)	Calotropina	4-8	ND
<i>Asclepias spp.</i> (algodoncillo)	Asclepaina	6-10	ND
<sup>a</sup> La capacidad para retener la actividad de digerir la cisteína los sustratos específicos de la enzima con cisteína, tal como la benzoil-arginil- <i>p</i> -nitroanilida a pHs sobre el umbral indicado. Abreviación: ND, no disponible (Tomado de Stepek <i>et al.</i> , 2004).			

La ficina es una cisteína-proteinasa, miembro de las enzimas proteolíticas del higo, papaya, piña y del kiwi, las cuales están relacionadas filogenética y funcionalmente (**Tabla 1**). Generalmente, se ha considerado que la mayoría de estas enzimas proteolíticas de origen vegetal requiere un grupo sulfhidrilo para su actividad (Steppek *et al.*, 2004).

La ficina es muy sensible a la inactivación por metales (hierro, cobre, aluminio) y agentes oxidantes (Englund *et al.*, 1968). Dicha enzima requiere ser activada por una variedad de agentes reductores para exhibir una actividad proteolítica máxima. Al parecer, el látex crudo contiene suficiente activador natural para permitir la actividad proteolítica.

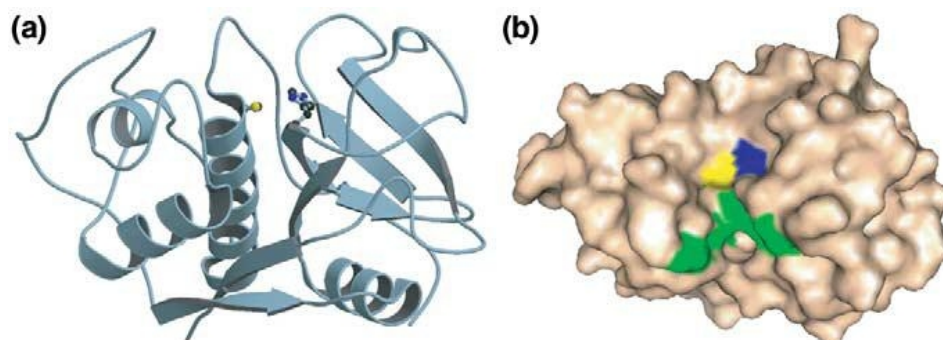
Se ha reportado que la ficina tiene varias isoformas proteolíticas las cuales que difieren notablemente en sus propiedades cromatográficas (Williams *et al.*, 1968; Kramer y Whitaker, 1969), llegando a considerarse diez confórmers que constan de una sola cadena polipeptídica de 25000 a 26000 de peso molecular (Jones y Glazer, 1969), entre las diferentes especies de *Ficus* cuyo látex tiene actividad proteolítica (Gaughran, 1976). Sin embargo, la solubilidad de estos componentes es esencialmente idéntica ya que no pueden separarse por las técnicas de fraccionamiento salino (Sgarbieri *et al.*, 1964). La presencia de más de un componente proteolítico enzimático en la ficina es indicada por los estudios sobre la especificidad de sustrato y estabilidad en calor, curva de actividad en el pH, y por los procedimientos de separación (Williams y Whitaker, 1969).

A nivel de la especie, las ficinas son producto de la expresión de diferentes genes. Existe la posibilidad de que la biosíntesis de la ficina esté bajo el control de un solo gen en cada planta, que este gen es diferente para cada especie y variedad, y que las múltiples formas moleculares dentro de cada ficina son determinadas por el plegado de la cadena peptídica (confórmero) (Williams y Whitaker, 1969).

#### **1.4. Estructura bioquímica de las cisteín-proteinasas vegetales**

Todas las cisteín-proteinasas de la familia de la papaína dependen de un grupo tiol reducido con un residuo de cisteína como nucleófilo, el cual está involucrado en la hidrólisis del

enlace peptídico. Constan de una sola cadena polipeptídica de 25 kDa que se pliega para formar una proteína globular con dos dominios (Stepek *et al.*, 2004) (**Figura 2**).



**Figura 2. Estructura de las cisteína-proteasas. (A) Diagrama de cintas de la estructura de la papaína.** La estructura es similar entre las diferentes cisteína-proteasas de la familia de la papaína, y los residuos de histidina y cisteína en el sitio catalítico (que se muestran en el diagrama) son idénticos. **(B)** La superficie accesible al solvente de la molécula de papaína que muestran la hendidura de unión al sustrato, va de arriba a abajo. Se muestran la superficie ocupada por los residuos de cisteína (amarillo) y de histidina (azul) del sitio activo, junto con el bolsillo principal de unión a los residuos hidrofóbicos (para unirse a la cadena lateral de un aminoácido hidrofóbico presente en el sustrato) en verde. (Tomado de Stepek *et al.*, 2004).

Las estructuras de estas enzimas son muy similares, el mecanismo catalizador es casi idéntico, y varían en otras características importantes tales como la resistencia a las condiciones de un medio ácido y susceptibilidad a la digestión por las enzimas del tracto digestivo (Tabla 1) (Rawlings y Barrett, 1994). Aunque, también pueden diferir en el alineamiento de sus aminoácidos (Williams *et al.*, 1968).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La población humana en general está expuesta a cerca de 300 especies de helmintos y más de 70 especies de protozoarios, siendo los más frecuentes cerca de 90 especies de parásitos, de los cuales algunos causan las enfermedades más importantes en el mundo (Cox, 2002).

Existen dos familias principales de los helmintos. Los *nemátodos*, conocidos también como lombrices, son los principales gusanos que afectan al intestino, junto con las filarias que causan la filariasis linfática y la oncocercosis. Los *tremátodos*, también conocidos como gusanos planos, tales como los esquistosomas, y las tenias, conocidas también como céstodos, tales como la tenia del cerdo que causa la cisticercosis.

Los tratamientos de estos parásitos intestinales se realizan con fármacos que no son siempre efectivos y que pueden generar resistencia. Además en cada caso de infección, el tratamiento debe ser bien valorado pues la droga utilizada suele ser muy tóxica.

Una alternativa en el tratamiento es el empleo de remedios tradicionales de origen vegetal, tal es el caso del látex de especies de *Ficus* spp., que se ha utilizado como remedio para los parásitos intestinales durante mucho tiempo entre grupos indígenas del área amazónica. En Bolivia, los pueblos tacanas emplean el látex de *Ficus maxima* conocido como (Maja pasha en dialecto tacana) como remedio natural contra los parásitos intestinales.

Para emplear productos naturales como medicinas, éstos deben ser validados de acuerdo al método científico de tal manera que su utilización sea respaldada por pruebas antiparasitarias y de toxicidad que estén validadas y que ayudarán a establecer qué sustancias tienen potencial para nuevos productos farmacéuticos.

Estas cisteína-proteinasas vegetales, poseen elevadas actividades proteolíticas, por lo que constituyen fuertes candidatos para el tratamiento de las infecciones producidas por los nemátodos gastrointestinales en los seres humanos.

Con este propósito, en el presente trabajo se hace una evaluación inicial del contenido de proteínas así como de la actividad proteolítica en diversas muestras del látex obtenido a partir de especies de *Ficus* spp., provenientes de diferentes lugares y estaciones.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo General

- Caracterizar el contenido de proteínas y la actividad proteolítica del látex proveniente de especies de *Ficus* spp., nativas provenientes de Bolivia y de Perú.

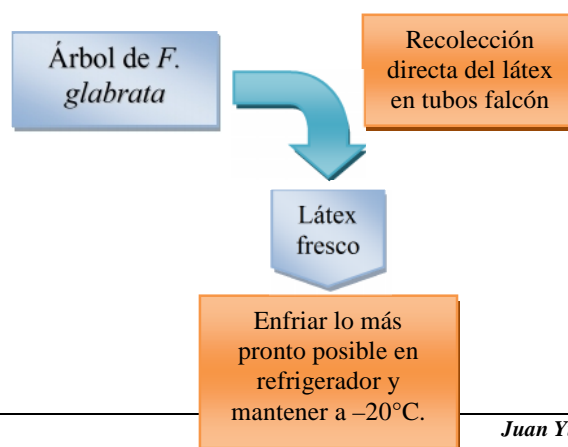
#### 3.2. Objetivos Específicos

- Recolectar muestras representativas del látex de *Ficus* spp., en función a distintas tres distintas épocas del año: primavera, verano y otoño; en dos diferentes naciones: Perú y Bolivia.
- Determinar el contenido de proteínas totales presentes en el látex de *Ficus* spp., de especies nativas provenientes de Bolivia y de Perú, mediante los métodos colorimétricos de Biuret y Lowry.
- Determinar la actividad coagulante sobre la leche para el látex de *Ficus* spp., de especies nativas provenientes de Bolivia y de Perú.
- Determinar la actividad proteolítica del látex de *Ficus* spp., de especies nativas de provenientes de Bolivia y de Perú, mediante la prueba colorimétrica de la hidrólisis de la azocaseína.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Recolección del látex

La recolección se hizo en tres épocas y en tres localidades diferentes y representativas.





La primera colecta se realizó en el mes de noviembre del año 2009 coincidente con el cambio de las estaciones de primavera-verano en el hemisferio austral, en la localidad de Buena Vista del departamento de La Paz, del Estado Plurinacional de Bolivia, así como en la población de Iquitos, del departamento de Loreto, en la República del Perú.

La segunda colecta se hizo en el mes de abril de 2010, coincidente con el cambio de las estaciones de verano-otoño en el hemisferio austral, pero esta vez sólo se realizó en la población de Iquitos, en el departamento de Loreto, de la República del Perú.

Se realizó una tercera colecta en los meses de noviembre y diciembre de 2010, coincidentes con el cambio de estaciones de verano-otoño en el hemisferio austral, en la localidad del campamento O.S.C.A.R., en el departamento de La Paz, del Estado Plurinacional de Bolivia. Todas las pruebas se realizaron con estas cinco diferentes muestras, las cuales fueron clasificadas según el detalle de la **Tabla 2**.

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Código de la muestra</b>	<b>Fecha de recolección</b>	<b>Estación (hemisferio austral)</b>	<b>Procedencia</b>
<i>Látex</i>	<i>BLPN09</i>	Noviembre de 2009	Primavera	Buena Vista, Departamento de La Paz, Bolivia.
<i>Látex</i>	<i>BLPN10</i>	Noviembre de 2010	Primavera	Sud Yungas, Departamento de La Paz, Bolivia.
<i>Látex</i>	<i>BLPD10</i>	Diciembre de 2010	Verano	Sud Yungas, Departamento de La Paz, Bolivia.
<i>Látex</i>	<i>PLoN09</i>	Noviembre de 2009	Primavera	Departamento de Loreto, Perú.
<i>Látex</i>	<i>PLoA10</i>	Abril de 2010	Otoño	Departamento de Loreto, Perú.

El procedimiento de recolección de las muestras de látex es relativamente simple. Se tiene noción que la hora más apropiada para obtener el látex es por las mañanas de 7:00 a 11:00, y el sitio del árbol a partir del cual se puede obtener una mayor cantidad del mismo es el lado del árbol orientado hacia el oeste, o sea del lado que está al abrigo del sol por las mañanas.

Se procede a realizar cortes diagonales forma de “v” en el tronco de los árboles, haciendo énfasis en el hecho de que la savia se encuentra en mayor cantidad del lado del árbol que no está orientado hacia la salida del sol, de manera que dicha recolección puede hacerse a partir de los extremos cortados del tronco, tal como se muestra en la **Figura 3** y en la **Figura 4**.



**Figura 3.** Incisión realizada sobre el árbol del bibosi blanco (*Ficus spp.*).

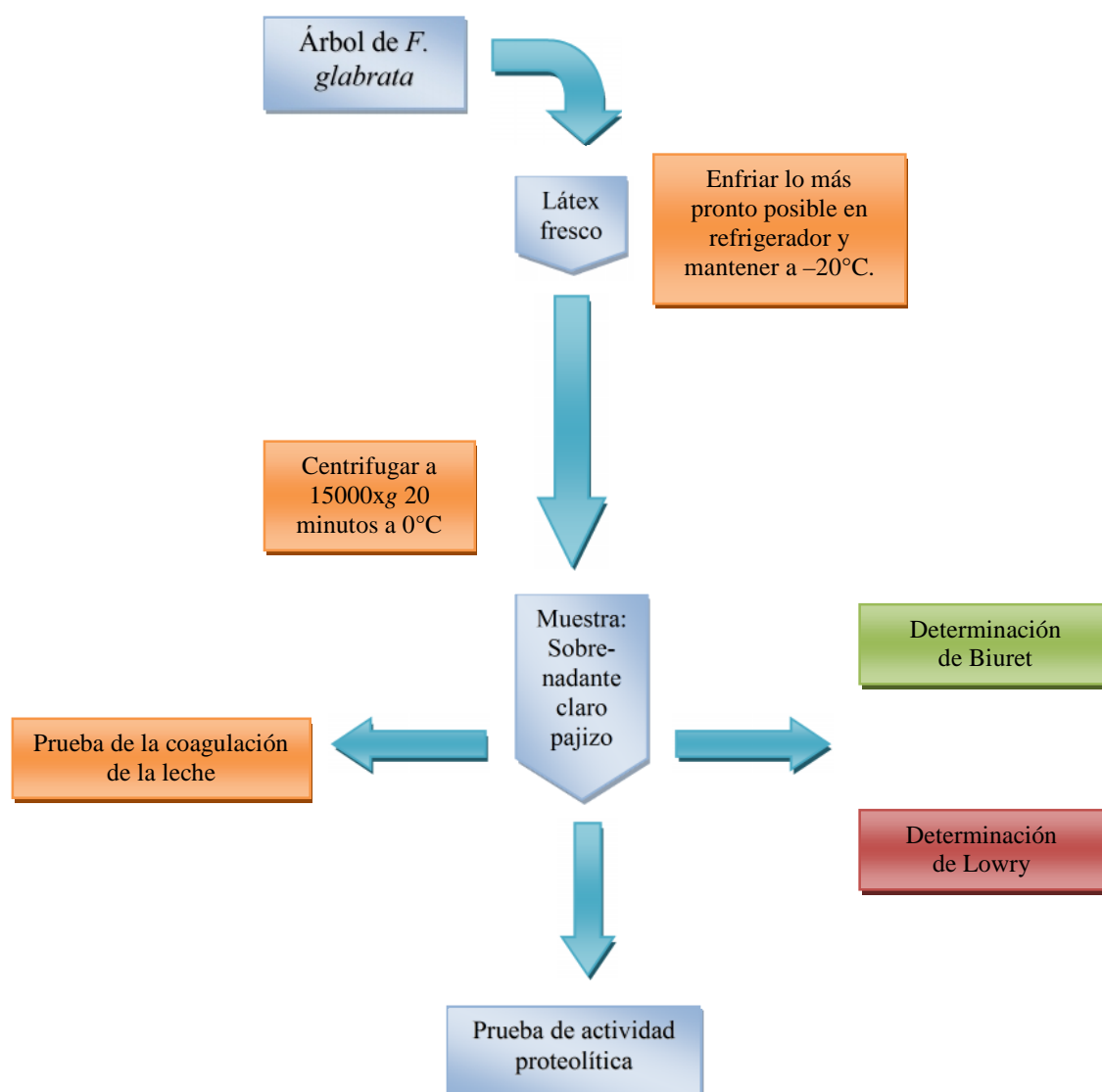


**Figura 4.** Recolección del látex del árbol del bibosi blanco (*Ficus spp.*) en un recipiente de polietileno.

Las gotas de látex fueron recolectadas directamente en recipientes de polietileno, para después ser reunidas en un sólo recipiente de la misma naturaleza y enfriarse lo más pronto posible.

Una vez en el laboratorio, el látex recolectado fue almacenado en un equipo refrigerador de marca *Whirlpool*<sup>®</sup>, manteniéndose a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta que fueran realizados los análisis pertinentes.

#### 4.2. Procesamiento del látex



El látex fue depositado en volúmenes de 2 ml en tubos Eppendorf, para separar la goma de la fase acuosa por centrifugación a  $15000 \times g$  durante 15 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$  en un equipo de *centrífuga refrigerada multirotor* modelo 2-16PK, de marca *sigma*<sup>®</sup>. (**Figura 5**).



**Figura 5.** *Centrífuga refrigerada multirotor* modelo 2-16PK, marca *sigma*<sup>®</sup>

Una vez obtenidas las fases acuosas, las mismas fueron alicuotadas, se congelaron y se almacenaron en el congelador del equipo refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser empleadas en las diferentes pruebas.

#### **4.3. Determinación del contenido de proteínas.**

Con el fin de determinar la concentración total de las proteínas que están presentes en la fase acuosa se emplearon dos métodos colorimétricos:

- Método de Lowry
- Método de Biuret

Para ambos métodos se empleó un equipo *lector en placas de 96 pozos Epoch*, modelo ELx800, marca *Biotek*<sup>®</sup> (**Figura 6**). Dicho equipo contaba con el programa de análisis *Gen5*, el cual permite realizar las mediciones espectrofotométricas a las diferentes longitudes de onda que se emplearon.

Las curvas de calibración en ambos métodos emplearon como proteína a la albúmina sérica bovina (BSA por las siglas en inglés de *Bovine Serum Albumin*; polvo liofilizado a pH ~7,1% con una pureza  $\geq 96\%$ ; Producto N° A2153-10G, de *Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

Como proteínas de referencia también se utilizó a las serina-proteasas ficina y papaína. La ficina tenía una actividad  $\geq 1,5$  unidades/mg de proteína, para 19 mg de proteína/ml de solución para 5,41 ml (N° F4125-200UN, de *Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

Para la papaína, el lote tenía  $\geq 23.9$  unidades/mg de proteína, para un lote de ~27,8 mg de proteína/ml de solución (N° 76216-250MG, de *Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis, Missouri, EE.UU.).



**Figura 6. Lector en placas Epoch modelo ELx800 de la marca Biotek®**

#### **4.3.1. Método de Lowry.**

El método de Lowry es un ensayo bioquímico para determinar el nivel total de proteínas en una solución. La concentración de proteínas totales se manifiesta por un cambio de color de la muestra, de manera proporcional a la concentración de proteínas, la cual puede medirse mediante técnicas colorimétricas.

Se llama así por el bioquímico Oliver H. Lowry, quien desarrolló la técnica en la década de 1940. Su artículo de 1951 que describe la técnica es uno de los documentos más citados en la biología (Lowry, 1951).

#### 4.3.1.1. Preparación del reactivo de Lowry

##### **Reactivo A:**

- **X:** Pesar 2 g de  $\text{CaCO}_3$  (carbonato de calcio) y disolver en una solución de NaOH (hidróxido de sodio) a 0,1 N, cantidad suficiente para 100 ml.
- **Y:** Pesar 1 g de  $\text{CuSO}_4$  (Sulfato cúprico) y disolver en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, cantidad suficiente para 100 ml.
- **Z:** Pesar 1 g de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (tartrato doble de sodio y potasio) y disolver en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, cantidad suficiente para 100 ml.
- Se debe mezclar en la relación: **X10 : Y0,1 : Z0,1**.

##### **Reactivo B (Folin-Ciocalteu):**

- Pesar 10 g de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (tungstato sódico) y 2,5 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (molibdato de sodio) y disolver en 70 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Añadir 5 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (ácido fosfórico) al 85% y 10 ml de HCl (ácido clorhídrico) concentrado. Reflujo durante 10 horas.
- 15 g de  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  (Sulfato de litio), disueltos en 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y una gota de Br (Bromo). Reflujo durante 15 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente y llevar a 100 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- En la solución se forman complejos hexavalentes de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico con las siguientes estructuras:



Este reactivo se debe mantener en refrigeración.

Para su uso se diluye inmediatamente antes en la relación de 1 parte de reactivo por 1 parte de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

#### 4.3.1.2. Mecanismo de la reacción de Lowry

El método combina las reacciones de los iones de cobre con los enlaces peptídicos en condiciones alcalinas (como la prueba de Biuret) con la oxidación de residuos de proteínas aromáticas. El método de Lowry se utiliza mejor con concentraciones de proteína de 0,01 a 1,0 mg/ml. y se basa en la reacción del  $\text{Cu}^{2+}$ , producido por la oxidación de los enlaces peptídicos, con el reactivo Folin-Ciocalteu (una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico en la reacción de Folin-Ciocalteu).

El mecanismo de reacción no se entiende bien, pero la reducción involucra el reactivo de Folin y la oxidación de los residuos aromáticos (principalmente triptófano y tirosina) (Figura 7). Se mide la absorbancia a 750 nm. Como resultado, la concentración total de proteína en la muestra se puede deducir de la concentración de residuos de triptófano y tirosina que reducen el reactivo Folin (Lowry, 1951).

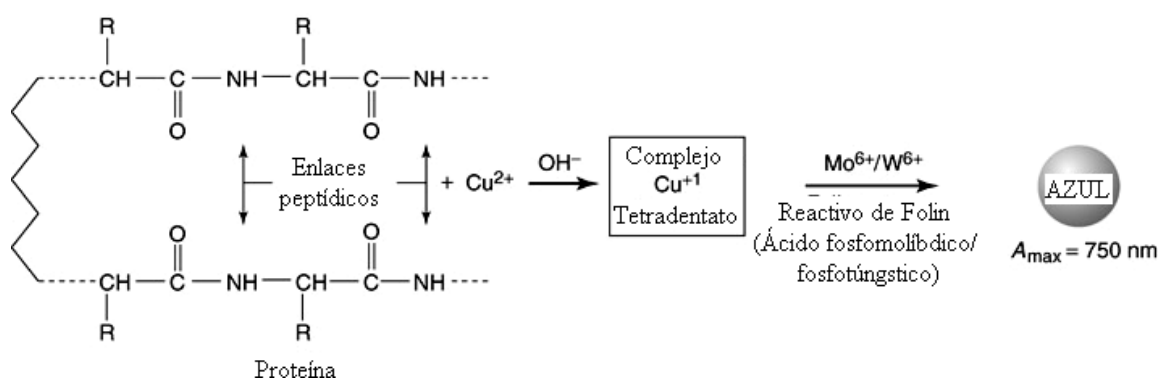


Figura 7. Mecanismo de la reacción de Lowry

#### 4.3.1.3. Procedimiento en la determinación de Lowry

El método consistió en mezclar 100  $\mu\text{l}$  del extracto acuoso con 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y añadir a esa mezcla 1 ml del *reactivo A* de Lowry.

Para el blanco de reactivo se debían mezclar 100  $\mu\text{l}$  del extracto acuoso calentado a ebullición durante 5 minutos con 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, para luego añadir 1 ml del *reactivo A* de Lowry a la mezcla.

Los tubos se deben mezclar por agitación y preincubar a 37°C durante 20 minutos. Una vez cumplido este tiempo, se deben añadir 100 µl del *reactivo B* de Lowry a cada tubo.

Los tubos deben agitarse y ser incubados nuevamente a 37°C durante 20 minutos. Después del periodo de incubación se debe dejar que los tubos enfríen para luego leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm de absorbancia.

#### **4.3.2. Método de Biuret.**

La reacción de Biuret se utiliza para determinar la concentración de proteínas debido a que los enlaces peptídicos se presentan con la misma frecuencia que los aminoácidos en el péptido.

##### **4.3.2.1. Composición del reactivo de Biuret**

- 1,5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 6 g de tartrato de sodio-potasio disueltos en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada cantidad suficiente para 500 ml.
- A la solución anterior añadir 300 ml de una solución de NaOH 2,5 N, agitando constantemente.
- Agregar 1 g de KI y agitar hasta diluir.
- Añadir  $\text{H}_2\text{O}$  cantidad suficiente para 1000 ml.
- Guardar al abrigo de la luz en frasco de color ámbar.

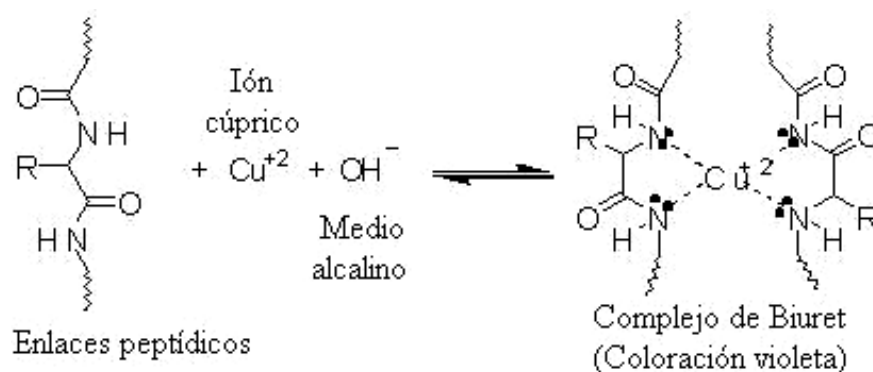
##### **4.3.2.2. Mecanismo de la reacción de Biuret**

La intensidad del color, y por lo tanto la absorción a 540 nm, es directamente proporcional a la concentración de proteínas, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

El método de Biuret consiste en tratar una proteína o péptido con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino, produciéndose una coloración violácea por formación de un complejo de coordinación entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y los pares electrónicos libres de los nitrógenos de los grupos imino de la unión peptídica.



Son necesarias por lo menos dos uniones peptídicas para que tenga lugar la reacción y que el medio sea alcalino. La reacción fue observada por primera vez por Ferdinand Rose en 1833 (Rose, 1833) (**Figura 8**).



**Figura 8. Mecanismo de reacción de Biuret**

#### 4.3.2.3. Procedimiento en la determinación de Biuret

El método consistió en añadir 600  $\mu\text{l}$  del reactivo de Biuret a 400  $\mu\text{l}$  de la muestra (fase acuosa del látex).

Como blanco de reactivo para llevar la lectura a cero se tenía 400  $\mu\text{l}$  de la muestra inactivada por ebullición a 80°C durante 5 minutos.

Los tubos de prueba fueron mezclados y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Los mismos se dejaron enfriar y se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm de absorbancia.

#### 4.4. Actividad coagulante sobre leche en polvo

Para el ensayo de la actividad de coagulación sobre la leche, se empleó como sustrato una solución al 10% de leche en polvo con un contenido bajo en lípidos.

En este ensayo, se agregaron 10 ml de la solución sustrato a 1 ml del extracto acuoso obtenido a partir del látex que contiene a la enzima cuya actividad proteolítica se va a determinar.

Se midió el tiempo en que se coagulaba la leche y se determinó el tiempo en segundos que le tomaba a la enzima coagular 10 ml de leche.

#### **4.5. Cuantificación de la actividad proteolítica**

Para esta prueba colorimétrica de degradación de la azocaseína se empleó el equipo *lector en placas de 96 pozos Epoc*, modelo *ELx800*, marca *Biotek*<sup>®</sup>, descrito anteriormente (**Figura 6**).

En la prueba de cuantificación de la actividad proteolítica también se utilizaron como proteasas de referencia a las serina-proteasas ficina y papaína.

La ficina tenía una actividad  $\geq 1,5$  unidades/mg de proteína, para un lote de  $\sim 19$  mg de proteína/ml de solución para 5,41 ml (N° F4125–200UN, de *Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis, Missouri, EE.UU.). Para la papaína, el lote tenía  $\geq 23,9$  unidades/mg de proteína, para un lote de  $\sim 27,8$  mg de proteína/ml de solución (N° 76216–250MG, de *Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis, Missouri, EE.UU.).

Para esta prueba, también se empleó como sustrato a la azocaseína (Producto N° A2765–25G, de *Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis, Missouri, EE.UU.). La azocaseína es un compuesto cromogénico empleada como sustrato para determinar la actividad proteolítica. La misma consta de caseína conjugada con un azo-tinte. Este es producto del acoplamiento de las aril aminas diazotizadas con las proteínas en una solución alcalina libera derivados cromóforos de la proteína.

La digestión de una solución de tales azoproteínas con enzimas proteolíticas resulta en la formación de los componentes de color que son solubles en ácido tricloroacético en el

sobrenadante, los cuales después de su neutralización, se pueden analizar cuantitativamente, determinando la absorbancia en el rango de 366 a 450 nm.

El método era una modificación del ensayo descrito por Christen y Marshall (citado en Bendicho et al., 2002). Brevemente: se agregaron 500 µl de la solución de azocaseína (solución al 1% en tampón fosfato a pH 7.2) a 50 µl de la muestra que contiene la enzima proteolítica (sobrenadante), a 50 µl de tampón fosfato que fue empleado como blanco. Se mezcló y se incubó a 37°C durante 15 minutos. La reacción se detuvo agregando 2 ml de ácido tricloroacético (ATA al 5%).

Tal como indica el método de Christen y Marshall, se determinó la densidad óptica del sobrenadante a 345 nm de absorbancia, en un espectrofotómetro UV/Visible. La actividad de la enzima se expresa en U/ml después de verificar la correlación lineal que existe entre los valores dados para el producto de la actividad proteolítica de la ficina estándar preparada a diferentes diluciones de dicha enzima, con la absorbancia o densidad óptica del sobrenadante en cada dilución.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Procesamiento del látex.**

Después de la recolección del látex a partir del árbol del bibosi blanco, el mismo fue depositado en tubos Eppendorf y los mismos fueron sometidos a una fuerza centrífuga, pudiéndose constatar que el volumen contenido en la fracción soluble, la fase acuosa, representaba aproximadamente del 70-80% del volumen total, quedando como residuo la fracción insoluble o la goma que ocupaba alrededor del 20-30%.

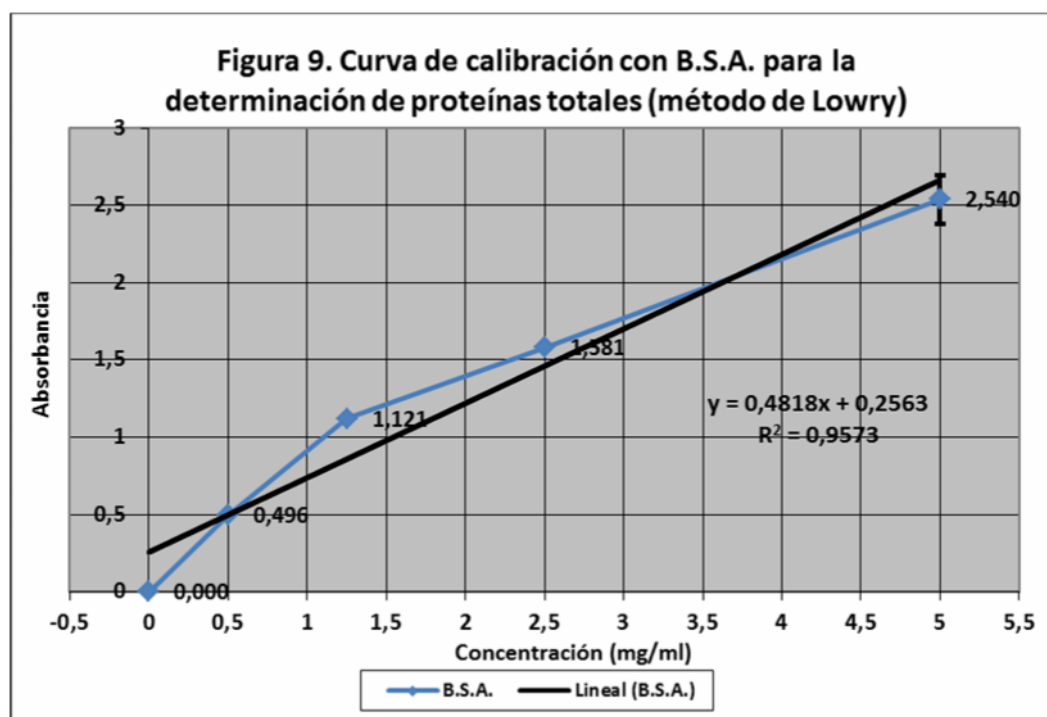
### **5.2. Determinación de la cantidad de proteínas totales.**

#### **5.2.1. Método de Lowry.**

En primera instancia se elaboró una curva de calibración empleando a la albúmina sérica bovina (B.S.A., por sus siglas en inglés) en diferentes concentraciones de: 0,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 2,5 mg/ml; y 5 mg/ml. Se obtuvieron los siguientes resultados presentados en la **Tabla 3** y en la **Figura 9**, los cuales permitieron determinar las concentraciones de las muestras problema.

<b>Tabla 3. Densidades ópticas para las diferentes concentraciones de B.S.A. mediante el método de Lowry.</b>	
<b>Concentración</b>	<b>Densidad óptica*</b>
0,0 mg/ml	0 ± 0
0,5 mg/ml	0,4957 ± 0,0064
1,25 mg/ml	1,121 ± 0,0076
2,5 mg/ml	1,581 ± 0,0095
5,0 mg/ml	2,540 ± 0,0158

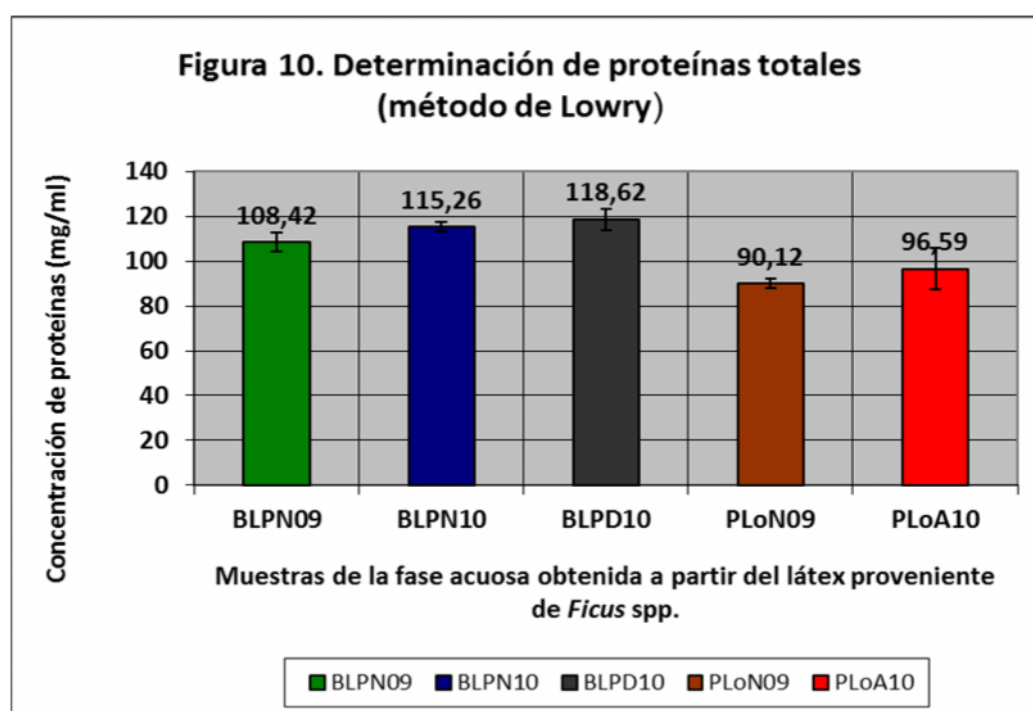
\*Promedio ± D.E. (*Desviación Estándar*) de 6 réplicas (para conocer el detalle de las lecturas y los cálculos realizados ver la **Tabla adicional 1** en **Anexos**).



Se realizó la determinación del contenido de proteínas mediante el ensayo de Lowry, que proporcionó el contenido de proteínas totales presentes en la fracción soluble obteniéndose los resultados presentados en la **Tabla 4** y en la **Figura 10**.

Muestra	Proteínas totales*	Densidad óptica*	Factor de dilución
<i>BLPN09</i>	108,41±4,12 mg/ml	0,7786±0,0198	100
<i>BLPN10</i>	115,26±2,03 mg/ml	0,8116±0,0097	100
<i>BLPD10</i>	118,62±4,68 mg/ml	0,8278±0,0225	100
<i>PLoN09</i>	90,12±2,05 mg/ml	0,6905±0,0098	100
<i>PLoA10</i>	96,59±9,04 mg/ml	0,7216±0,0435	100

\*Promedio ± D.E. (*Desviación Estándar*) de 6 réplicas.



Las muestras *BPLN09*, *BPLN10* y *BPLD10*, del departamento de La Paz, Bolivia, tienen un contenido de proteínas de 108,41±4,12 mg/ml; 115,26±2,03 mg/ml y 118,62±4,68 mg/ml, respectivamente. Mientras que las muestras *PLoN09* y *PLoA10*, del departamento de Loreto en Perú, tienen valores de 90,12±2,05 mg/ml y 96,59±9,04 mg/ml, respectivamente.

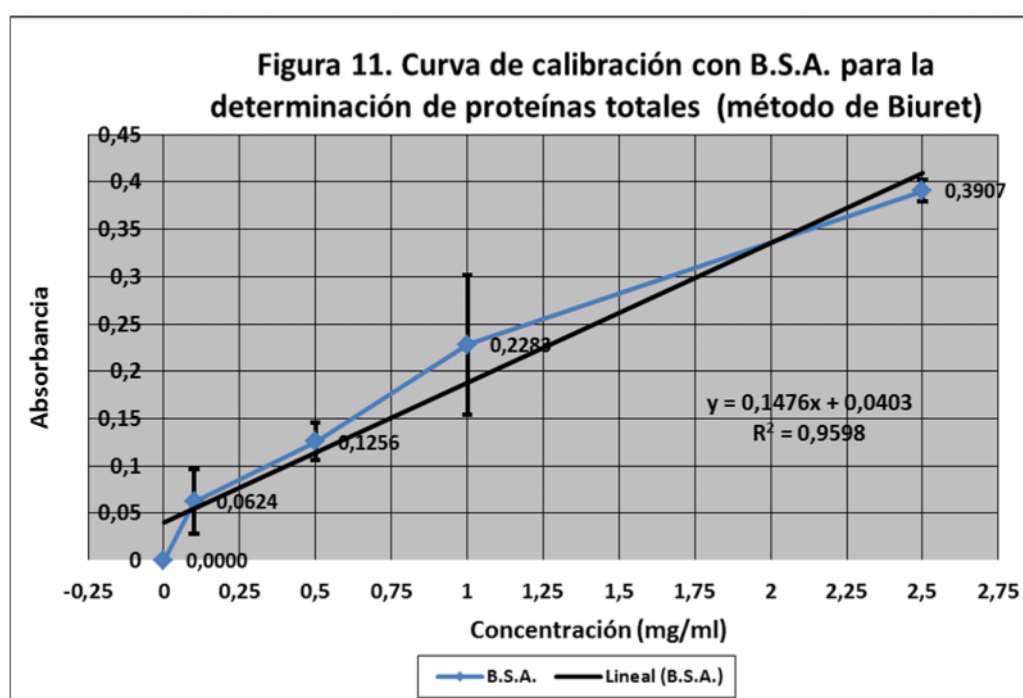
### 5.2.2. Método de Biuret.

Primero se elaboró una curva de calibración empleando a la B.S.A. en diferentes concentraciones de: 0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 2,5 mg/ml; 5,0 mg/ml; 7,5 mg/ml; 10,5 mg/ml; y 5 mg/ml. Se obtuvieron los siguientes resultados presentados en la **Tabla 5** y en la **Figura 11**, los cuales permitieron determinar las concentraciones de las muestras problema mediante este método.

**Tabla 5. Densidades ópticas para las diferentes concentraciones de B.S.A. mediante el método de Biuret**

Concentración	Densidad óptica*
0,000 mg/ml	0
0,1 mg/ml	0,0624±0,0339
0,5 mg/ml	0,1256±0,0198
1,0 mg/ml	0,2280±0,0738
2,5 mg/ml	0,3915±0,0104

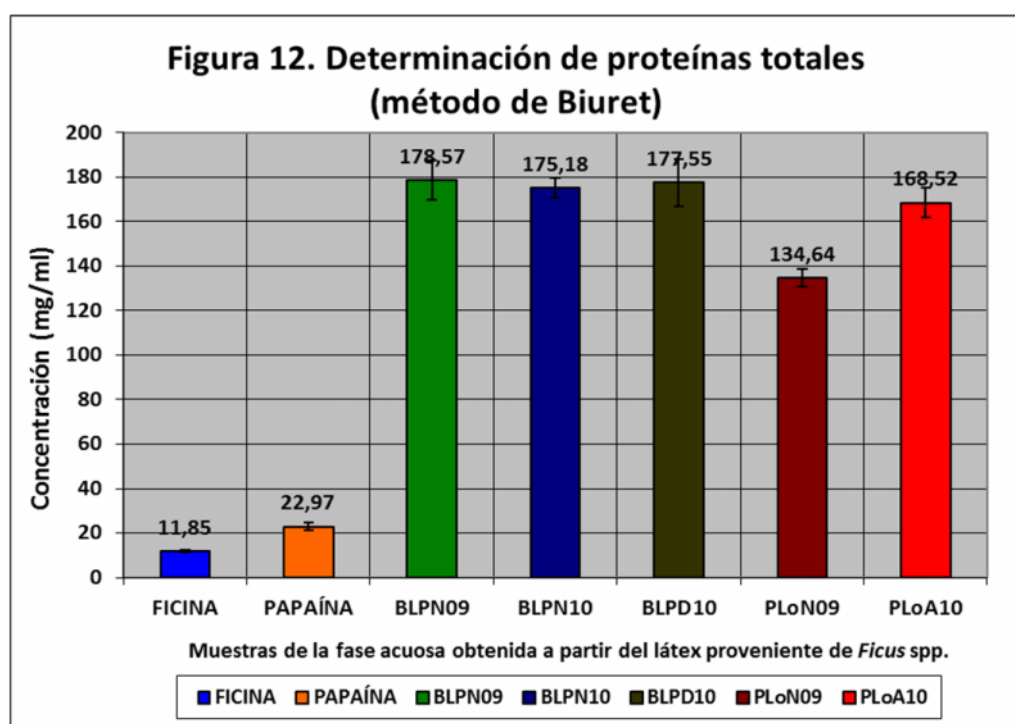
\*Promedio ± D.E. (Desviación Estándar) de 6 réplicas.



Mediante el método de Biuret, se determinó la concentración de proteínas totales presentes en las fracciones solubles del látex obtenido a partir de *Ficus* spp., consiguiéndose los resultados preliminares para la cantidad de proteínas presentes en las fases acuosas de dicho látex. En esta etapa se emplearon a la ficina y a la papaína como patrones del contenido de proteínas para comprobar la confiabilidad del método de Biuret en la determinación de proteínas totales, y los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 6** y en la **Figura 12**.

Muestra	Proteínas totales*	Densidades ópticas*	Factor de dilución
FICINA	11,84±0,607 mg/ml	0,2225±0,0089	100
PAPAÍNA	22,96±1,645 mg/ml	0,0815±0,0024	100
<i>BLPN09</i>	178,57±8,775 mg/ml	0,3111±0,0129	100
<i>BLPN10</i>	175,18±4,357 mg/ml	0,3061±0,0064	100
<i>BLPD10</i>	177,55±10,545 mg/ml	0,3096±0,0155	100
<i>PLoN09</i>	134,64±4,011 mg/ml	0,2463±0,0059	100
<i>PLoA10</i>	168,52±6,702 mg/ml	0,2963±0,0098	100

\*Promedio ± D.E. (Desviación Estándar) de 6 réplicas.



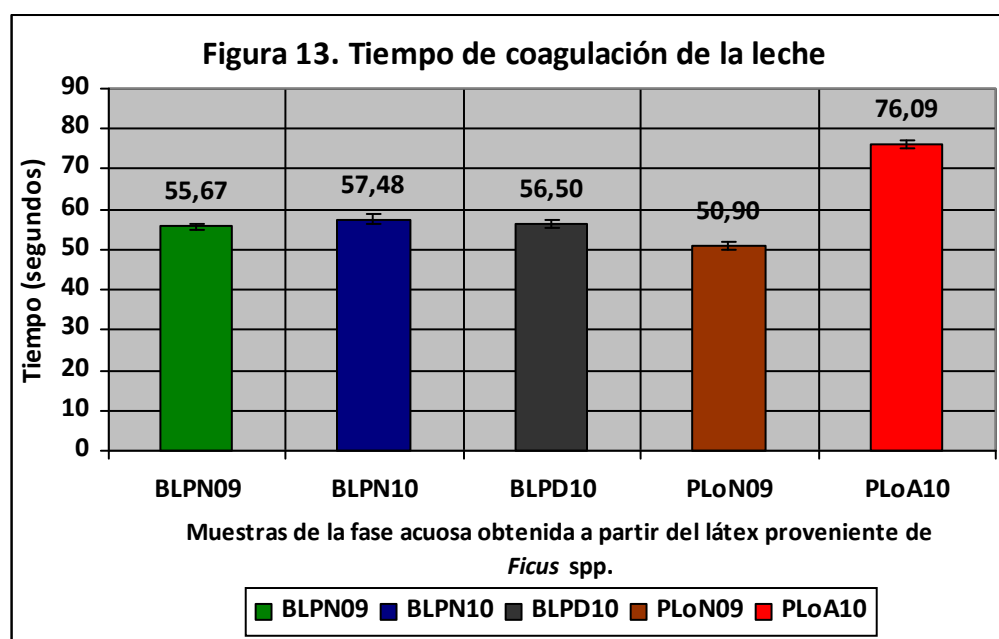
Las muestras *BLPN09*, *BLPN10* y *BLPD10*, obtenidas en el departamento de La Paz, Bolivia, tienen un contenido de proteínas totales de 178,57 mg/ml; 175,18 mg/ml; y 177,55 mg/ml, respectivamente. En el caso de las muestras *PLoN09* y *PLoA10*, obtenidas en el departamento de Loreto en Perú, las mismas tienen valores de proteínas totales de 134,64 mg/ml y de 168,52 mg/ml, respectivamente.

### 5.3. Actividad coagulante sobre leche en polvo

Los diferentes tiempos de coagulación para la leche son los que se indica a continuación en la **Tabla 7** y en la **Figura 13**.

Muestra	Tiempo*
<i>BLPN09</i>	55,67±0,815 segundos
<i>BLPN10</i>	57,48±1,268 segundos
<i>BLPD10</i>	56,50±1,031 segundos
<i>PLoN09</i>	50,90±0,98 segundos
<i>PLoA10</i>	76,09±0,837 segundos

\*Promedio ± D.E. (*Desviación Estándar*) de 3 réplicas.





El tiempo de coagulación para las muestras *BPLN09*, *BPLN10* y *BPLD10*, obtenidas en el departamento de La Paz, Bolivia, fue de  $55,67 \pm 0,815$  segundos;  $57,48 \pm 1,268$  segundos; y  $56,50 \pm 1,031$  segundos, respectivamente.

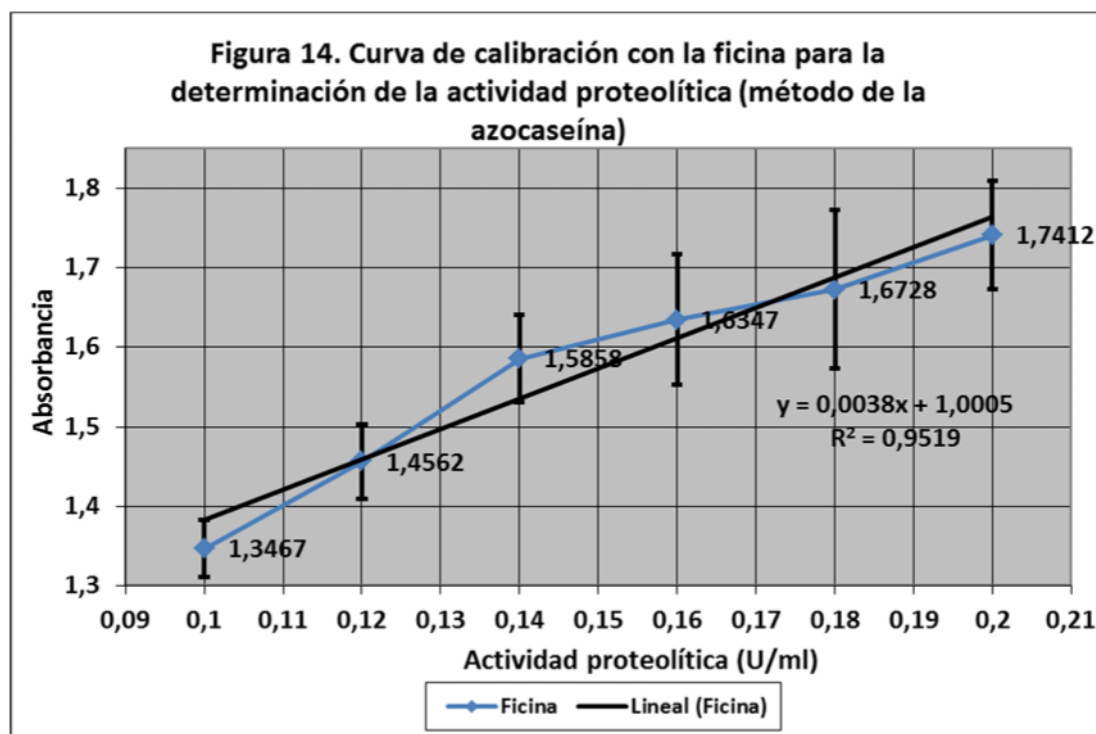
Las muestras *PLoN09* y *PLoA10*, obtenidas en el departamento de Loreto en Perú, tienen valores de  $50,90 \pm 0,98$  segundos y de  $76,09 \pm 0,837$  segundos.

#### 5.4. Cuantificación de la actividad proteolítica mediante el método de la azocaseína.

Inicialmente se elaboró una curva de calibración para determinar los valores de la actividad proteolítica mediante el método de la azocaseína, empleando a la ficina como estándar.

El rango de valores utilizado iba desde 0,10 U/ml; 0,12 U/ml; 0,14 U/ml, 0,16 U/ml; 0,18 U/ml y de 0,20 U/ml, obteniéndose los valores de absorbancia que se presentan en la **Tabla 8** y en la **Figura 14**.

<b>Tabla 8. Densidades ópticas para las diferentes concentraciones de ficina mediante el método de la azocaseína para la cuantificación de la actividad proteolítica</b>	
<b>Actividad</b>	<b>Densidad óptica*</b>
0,10 U/ml	$1,346 \pm 0,036$
0,12 U/ml	$1,456 \pm 0,047$
0,14 U/ml	$1,585 \pm 0,055$
0,16 U/ml	$1,634 \pm 0,082$
0,18 U/ml	$1,672 \pm 0,100$
0,20 U/ml	$1,741 \pm 0,068$
*Promedio $\pm$ D.E. ( <i>Desviación Estándar</i> ) de 6 réplicas.	

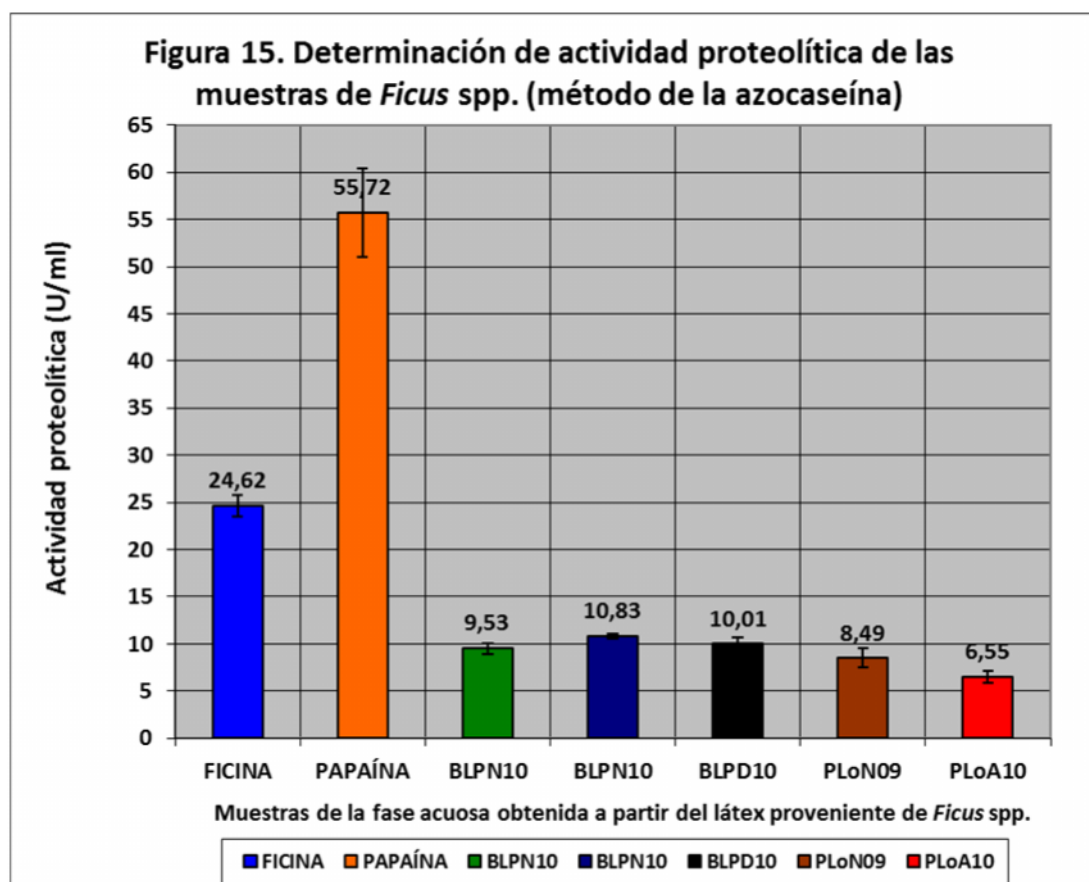


Una vez hecha la curva de calibración, El método empleado nos permitió determinar la actividad proteolítica de las dos proteasas de referencia, la ficina y la papaína, además de las diferentes muestras, obteniéndose los resultados que se presentan en la **Tabla 9** y en la **Figura 15**.

**Tabla 9. Cuantificación de la actividad proteolítica determinada por el método de la azocaseína**

Muestra	Actividad proteolítica*	Densidad óptica*	Factor de dilución
FICINA	24,62±1,17 U/ml	1,9361±0,0444	100
PAPAÍNA	55,71±4,6 U/ml	1,2122±0,0177	1000
<i>BLPN09</i>	9,53±0,57 U/ml	1,3627±0,0217	100
<i>BLPN10</i>	10,82±0,22 U/ml	1,4118±0,0086	100
<i>BLPD10</i>	10,01±0,66 U/ml	1,3808±0,0251	100
<i>PLoN09</i>	8,49±0,1 U/ml	1,3232±0,0382	100
<i>PLoA10</i>	6,55±0,64 U/ml	1,25±0,0244	100

\*Promedio ± D.E. (Desviación Estándar) de 9 réplicas.



Las muestras *BPLN09*, *BPLN10* y *BPLD10*, obtenidas en el departamento de La Paz, Bolivia, tienen actividades proteolíticas de  $9,53 \pm 0,57$  U/ml;  $10,82 \pm 0,22$  U/ml; y de  $10,01 \pm 0,66$  U/ml, respectivamente.

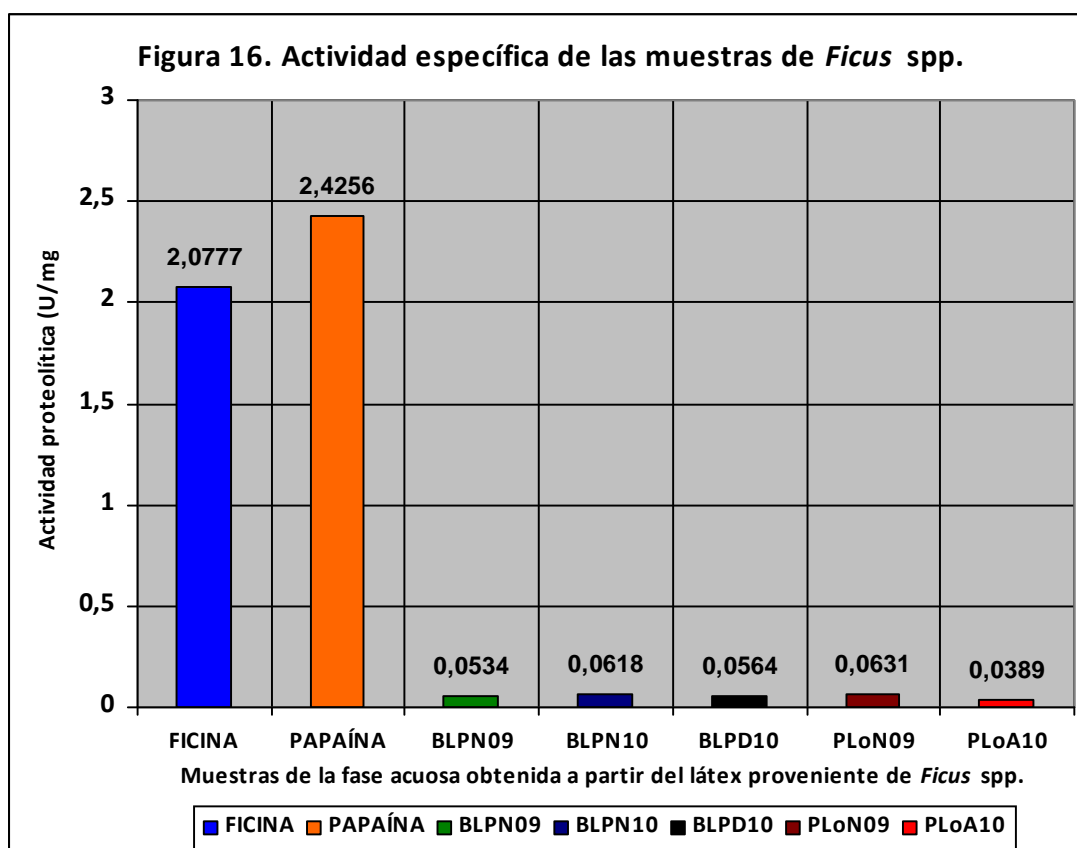
En el caso de las muestras *PLoN09* y *PLoA10*, obtenidas en el departamento de Loreto en Perú, las mismas tienen actividades proteolíticas de  $8,49 \pm 1$  U/ml y de  $6,55 \pm 0,64$  U/ml, respectivamente.

### 5.5. Cuantificación de la actividad proteolítica específica.

A fin de proporcionar unidades de medida más precisa tenemos la actividad específica que se define como las Unidades de enzima proteolítica/mg de proteína (U/mg), tal como se presentan en la **Tabla 10** y en la **Figura 16**.

**Tabla 10. Actividad proteolítica específica de *Ficus* spp.**

Muestra	Proteínas totales	Actividad proteolítica	Actividad específica
<i>FICINA</i>	11,84 mg/ml	24,62 U/ml	2,0777 U/mg
<i>PAPAÍNA</i>	22,96 mg/ml	55,71 U/ml	2,4256 U/mg
<i>BLPN09</i>	178,57 mg/ml	9,53 U/ml	0,0533 U/mg
<i>BLPA10</i>	175,18 mg/ml	10,82 U/ml	0,0618 U/mg
<i>BLPN10</i>	177,55 mg/ml	10,01 U/ml	0,0563 U/mg
<i>PLoN09</i>	134,64 mg/ml	8,49 U/ml	0,0631 U/mg
<i>PLoA10</i>	168,52 mg/ml	65,54 U/ml	0,0389 U/mg



Los valores para las actividades específicas eran de 0,0533 U/mg; 0,0618 U/mg; 0,0563 U/mg; 0,0631 U/mg y de 0,0389 U/mg, para las muestras *BPLN09*, *BPLN10*, *BPLD10*, *PLoN09* y *PLoA10*, respectivamente.

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el contenido de proteínas totales presentes en el sobrenadante obtenido mediante centrifugación del látex de *Ficus* spp., compone aproximadamente el 16,7% de su contenido líquido en relación a la determinación realizada con la prueba de Biuret.

En lo que se refiere a los métodos ensayados para la determinación de proteínas (de Lowry y de Biuret) podemos indicar que debido a su sensibilidad, el ensayo de Lowry está indicado para detectar concentraciones menores de proteína de 0,01 a 1,0 mg/ml, en razón a que éste método es más apropiado para determinar la concentración de proteínas totales que son producto del metabolismo de los microorganismos bacterianos o fúngicos, por lo que los resultados obtenidos se presentan sólo como referencia.

Además, en razón a que las proteasas de origen vegetal son producidas en concentraciones mucho mayores a las que se pueden obtener en otros organismos tales como las bacterias o los hongos anteriormente mencionados, se escogió el método de Biuret como el método a emplearse para la cuantificación de las proteínas, así como los datos obtenidos con este ensayo, para determinar las diferentes concentraciones del contenido de proteínas totales presentes en el látex de *Ficus* spp.

Los resultados indican que las diferentes muestras presentan un elevado contenido de proteínas totales en la fase acuosa del látex, el cual se mantiene bastante bien en condiciones de refrigeración, pudiendo realizarse determinaciones en diferentes lapsos de tiempo, las cuales siguen dando resultados confiables y reproducibles, tanto al emplearse las fases acuosas en repetidas ocasiones, así como las muestras de látex sin centrifugar.

Esta observación es muy útil, por cuanto el almacenamiento del látex para su posterior utilización no representa mayor dificultad, mucho más si se guardan grandes cantidades en

condiciones de temperatura ambiente de moderada a elevada, humedad relativa alta, y en exposición directa a la luz del sol, tal como se lo hace en algunas localidades en la República de Perú, donde se lo manipula comercialmente bajo estas condiciones y sigue manteniendo su actividad por varios meses, los cuales se pueden extender hasta incluso a un par de años cuando el látex se almacena en condiciones de refrigeración.

En cuanto al ensayo de la coagulación de la leche, la prueba si bien es burda y simple tiene el beneficio de que se puede extrapolar fácilmente a una ambiente común y sencillo como el caso de un ambiente común como una cocina, donde cualquier persona de manera práctica puede evaluar la actividad biológica del látex sobre una cantidad determinada de leche, obteniendo así un indicio de cuan elevada es la actividad proteolítica del látex, de una manera un tanto empírica pero bastante evidente, en función al tiempo empleado por dicho látex para coagular la leche.

Para el ensayo de la azocaseína, el método empleado nos permite determinar la actividad proteolítica empleando micro-volúmenes y un tiempo de incubación más reducido, lo cual permite emplear una pequeña cantidad de látex procesado y propiamente una menor proporción de la fase acuosa, con lo que puede realizarse una mejor evaluación al poder prepararse un mayor número de réplicas tal como se hizo en los diferentes ensayos en varias oportunidades durante el desarrollo del trabajo.

Los resultados obtenidos nos indican una elevada actividad proteolítica de la fase acuosa proveniente del látex obtenido del bibosi blanco, si bien sugieren indicios claros de que dicha actividad es mucho más elevada en las muestras obtenidas en el Estado Plurinacional de Bolivia, también indican que la metodología debe ser optimizada a fin de obtener datos más confiables, por cuanto el mérito del presente trabajo es que puede considerarse el primer esbozo de un estudio orientado a desarrollar una metodología mucho más refinada y confiable, la cual puede desarrollarse realizando modificaciones mucho más finas al procedimiento para determinar la actividad proteolítica de una manera mucho más confiable y precisa en lo que se refiere al componente cuantitativo.

Los valores obtenidos para las proteasas de referencia tales como la ficina y la papaína se aproximan a los valores reales declarados en la composición del fabricante, pero todavía queda refinar la metodología mucho más a fin de obtener valores que puedan respaldar de manera mucho más contundente la actividad biológica del látex, mucho más aún si se quiere emplear dicho producto vegetal de acuerdo a su uso tradicional como agente desparasitante por vía oral.

Para finalizar debe hacerse hincapié en el hecho de que los diferentes ensayos empleados deben ser optimizados y realizarse pruebas que sean mucho más representativas y descriptivas de la actividad biológica de los extractos vegetales, por cuanto una vez que las propiedades de este tipo de extractos sean evaluadas en cuanto a sus componentes cualitativo y cuantitativo, nos permitirá validar a dichos productos naturales y emplearlos de acuerdo a lo que indica su uso tradicional, pero sin el temor de producirse efectos secundarios indeseados.

## **7. CONCLUSIONES**

### **7.1. Conclusión General**

- Se caracterizaron los componentes responsables de la actividad proteolítica del bibosi blanco, identificándolos de manera general como proteínas de elevada actividad proteolítica, mayor a la reportada en bibliografía para otras plantas del mismo género de plantas las cuales están presentes en las fases acuosas del látex obtenido mediante centrifugación a partir de *Ficus* spp., proveniente de especies nativas provenientes de Bolivia y de Perú.

### **7.2. Conclusiones Específicas**

- Se recolectaron muestras representativas en tres épocas y en tres localidades diferentes. En el mes de noviembre del año 2009 (primavera-verano austral), en la localidad de Buena Vista del departamento de La Paz, del Estado Plurinacional de Bolivia, así como

en la población de Iquitos, del departamento de Loreto, en la República del Perú. En el mes de abril de 2010 (verano-otoño austral), sólo en la población de Iquitos, en el departamento de Loreto, de la República del Perú. Y finalmente en los meses de noviembre y diciembre de 2010 (primavera austral) en el campamento O.S.C.A.R., departamento de La Paz, en el Estado Plurinacional de Bolivia.

- Se determinó el contenido de las proteínas totales presentes en las fases acuosas obtenidas a partir del látex de *Ficus* spp. de especies nativas de Bolivia y de Perú, siendo de 178,57 mg/ml, 175,18 mg/ml, y 177,55 mg/ml para las muestras *BPLN09*, *BPLN10*, *BPLD10*, respectivamente; y de 134,64 mg/ml y 168,52 mg/ml, para las muestras *PLoN09* y *PLoA10*, respectivamente.
- Se determinaron los tiempos de coagulación de la leche para las fases acuosas obtenida a partir del látex de *Ficus* spp. de especies nativas de Bolivia y de Perú, en 55,67 segundos; 57,48 segundos; y 56,50 segundos 55,67 segundos; para las muestras *BPLN09*, *BPLN10* y *BPLD10*, respectivamente; y de 50,90 segundos y de 76,09 segundos para las muestras *PLoN09* y *PLoA10*, también respectivamente.
- Se midió la actividad proteolítica de las fases acuosas obtenidas a partir del látex de *Ficus* spp. para especies nativas de Bolivia y de Perú, en 9,53 U/ml; 10,82 U/ml; y de 10,01 U/ml; 8,49 U/ml y de 6,55 U/ml, para las muestras *BPLN09*, *BPLN10* y *BPLD10*, *PLoN09* y *PLoA10*, respectivamente. Adicionalmente se determinaron las actividades específicas de 0,0533 U/mg para *BPLN09*; 0,0618 U/mg para *BPLN10*; 0,0563 U/mg para *BPLD10*; 0,0631 U/mg para *PLoN09*, y de 0,0389 U/mg para *PLoA10*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham K.I. y Joshi P.N. (1979) **Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex I: Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate.** *Biochim. Biophys. Acta* 568, 111–119.



2. Bendicho S., Martí G., Hernández T., y Martín O. (2002) **Determination of proteolytic activity in different milk systems.** *Food Chemistry* 79. 245–249.
3. Balls A.K., Lineweaver H. y Thompson R.R. (1937) **Crystalline papain.** *Science* 86, 379.
4. Brockbank, W.J. y Lynn, K.R. (1979) **Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L (milkweed).** *Biochim. Biophys. Acta* 578, 13–22.
5. Brocklehurst K, Baines B.S. y Malthouse J.P. (1981) **Differences in the interactions of the catalytic groups of the active centres of actinidin and papain. Rapid purification of fully active actinidin by covalent chromatography and characterization of its active centre by use of two-protonic-state reactivity probes.** *Biochem. J.* 197, pp.: 739–746.
6. Buttle D.J., Kembhavi A.A., Sharp S.L., Shute R.E., Rich D.H. y Barrett A.J. (1989) **Affinity purification of the novel cysteine proteinase papaya proteinase IV and papain from papaya latex.** *Biochem. J.* 261, 469–476.
7. Chittenden, R.H. (1894) **On the proteolytic action of bromelin, the ferment of pineapple juice.** *J. Physiol.* 15, 249–310.
8. Cox, F.E.G. (2002) **History of Human Parasitology.** *Microbiology Reviews* 15(4), 595-612.
9. Englund P.T., King T.P., Craig L.C., Walti A. (1968) **Ficin. I. Its isolation and characterization.** *Biochemistry*, 1968, 7 (1), pp. 163–175.

10. FONAMA–IRD–UMSA–CIPTA. (1999) *Tacana: Ecuánasha aquí, ecuanasha id'rene cuana, me schanapaque*. Primera Edición, Ediciones Plural: La Paz, pp.: 231–133.
11. Gaughran, E.R.L. (1976) *Ficin: history and present status*. *Q. J. Crude Drug Res.* 14, pp. 1–21
12. Hansson A., Veliz G., Naquira C., Amrenc M., Arroyo M. y Arévalo G. (1986) *Preclinical and clinical studies with latex from Ficus glabrata HBK, a traditional intestinal anthelmintic in the amazonian area*. *Journal of Ethnopharmacology*, 17 105–138.
13. Heinicke R.M. y Gortner W.A. (1957) *Stem bromelain - a new protease preparation from pineapple plants*. *Econ. Bot.* 11, 225–234.
14. Jansen E.F. y Balls A.K. (1941) *Chymopapain: a new crystalline proteinase from papaya latex*. *J. Biol. Chem.* 137, 459–460.
15. Kramer D.E. y Whitaker J.R. (1964) *Ficus enzymes II: Properties of the proteolytic enzymes from the latex of Ficus carica variety Kadota*. *J. Biol. Chem.* 239, 2178–2183.
16. Kramer D.E. y Whitaker J.R. (1969) *Multiple Molecular Forms of Ficin-Evidence Against Autolysis as Explanation*. *Plant Physiol.* 44, pp. 1560–1565.
17. Lansky E.P. y Paavilainen H. M. (2011) *Figs: The Genus Ficus (Traditional Herbal Medicines for Modern Times; v. 9)* CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, U.S.A.

18. López J.E. y de Kiyán C.I. (1974) *Plantas medicinales del Perú IV*, Ojé, Huito, Huitoc. *Biota* 10, pp. 34–40.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.* 193 (1): pp. 265–75.
20. Napper A.D., Bennett S.P., Borowski M., Holdridge M.B., Leonard M.J., Rogers E.E., Duan Y., Laursen R.A., Reinhold B., y Shames S.L. (1994) *Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain*. *Biochem. J.* 301, 727–735.
21. Orlacchio A., Maffei C., Emiliani C. y Reinoso J.A. (1985) *On the active site of -hexosaminidase from latex of Ficus glabrata*. *Phytochemistry*, vol.24, n.4, pp. 659–662.
22. Rawlings N.D. y Barrett A.J. (1994) *Families of cysteine peptidases*. En *Methods in Enzymology (Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases)* (Barrett, A.J., ed), 244, pp. 461–486.
23. Robbins B.H. (1930) *A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of Leche de Higueron*. *J. Biol. Chem.* 87, pp. 251–257.
24. Robbins B. y Lamson P. (1934) *Further studies on the proteolytic enzyme content of latex from the fig and related trees*.
25. Robinson G.W. (1975) *Isolation and characterization of papaya peptidase A from commercial chymopapain*. *Biochemistry* 14, 3695–3700.
26. Rose F. (1833) "*Über die Verbindungen des Eiweiss mit Metalloxyden*" (*Sobre los componentes de la albumina con óxidos metálicos*), *Poggendorfs Annalen der*

*Physik und Chemie (anales de física y química de Poggendorf)*, vol. 28, pp. 132-142.

27. Rowan A.D., Buttle D.J. y Barrett A.J. (1988) *Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem*. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, pp. 262–270.
28. Stepek G., Behnke J.M., Buttle D.J. y Duce I.R. (2004) *Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? TRENDS in Parasitology* Vol.20 No.7, pp. 322–327.
29. Williams D.C., Sgarbieri V.C., y Whitaker J.R. (1968) *Proteolytic Activity in the Genus Ficus*. *Plant Physiol.* 43, pp. 1083–1088.
30. Williams D.C. y Whitaker J.R. (1969) *Multiple Molecular Forms of Ficus glabrata Ficin. Their Separation and Relative Physical, Chemical, and Enzymatic Properties*. *Plant Physiol.* 44, 1574–1583.

## 9. ANEXOS

**Tabla Suplementaria 1. Detalle de las densidades ópticas para las diferentes concentraciones de B.S.A. mediante el método de Lowry**

B.S.A.	Densidades ópticas						Promedio	Desviación estándar
	1	2	3	4	5	6		
0 g/l	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 g/l	0,499	0,501	0,489	0,482	0,495	0,511	0,49616667	0,0064291
1,25 g/l	1,119	1,124	1,134	1,116	1,106	1,128	1,12116667	0,00763763
2,5 g/l	1,568	1,579	1,587	1,593	1,561	1,599	1,58116667	0,00953939
5 g/l	2,523	2,502	2,533	2,547	2,571	2,561	2,5395	0,01582193

**Tabla Suplementaria 2. Detalle de la determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Lowry**

Muestras	Parámetro	Réplicas			
		1	2	3	4
<b>BLPN09</b> 1/100	<i>Densidad óptica</i>	0,776	0,752	0,774	0,793
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	107,86633	102,88501	107,45122	111,39477
<b>BLPN10</b> 1/100	<i>Densidad óptica</i>	0,809	0,801	0,803	0,815
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	114,71565	113,05521	113,47032	115,96098
<b>BLPD10</b> 1/100	<i>Densidad óptica</i>	0,851	0,812	0,838	0,809
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	123,43296	115,33831	120,73474	114,71565
<b>PLoN09</b> 1/100	<i>Densidad óptica</i>	0,691	0,686	0,683	0,681
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	90,224159	89,186384	88,563719	88,148609
<b>PLoA10</b> 1/100	<i>Densidad óptica</i>	0,691	0,686	0,683	0,794
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	90,224159	89,186384	88,563719	111,60232

Tabla Suplementaria 2 (continuación). Detalle de la determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Lowry					
Muestras	Parámetro	Réplicas		Promedio	Desviación estándar
		5	6		
<b>BLPN09</b> <b>1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,809	0,768	0,77866667	0,0198964
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	114,71565	106,20589	108,419815	4,129597
<b>BLPN10</b> <b>1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,828	0,8138	0,81163333	0,00978196
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	118,65919	115,71191	115,262211	2,03029393
<b>BLPD10</b> <b>1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,854	0,803	0,82783333	0,02256915
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	124,05562	113,47032	118,624602	4,6843406
<b>PLoN09</b> <b>1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,708	0,694	0,6905	0,00985393
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	93,752594	90,846824	90,1203819	2,04523313
<b>PLoA10</b> <b>1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,737	0,739	0,72166667	0,04353236
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	99,771689	100,1868	96,5891795	9,03535978

Tabla Suplementaria 3. Detalle de las densidades ópticas para las diferentes concentraciones de B.S.A. mediante el método de Biuret											
B.S.A.	Densidades ópticas										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>0,0 mg/ml</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>0,1 mg/ml</b>	0,073	0,081	0,077	0,02	0,021	0,022	0,087	0,094	0,091	0,032	0,034
<b>0,5 mg/ml</b>	0,112	0,126	0,121	0,098	0,101	0,103	0,128	0,142	0,134	0,111	0,114
<b>1,0 mg/ml</b>	0,143	0,155	0,146	0,285	0,289	0,291	0,156	0,17	0,16	0,298	0,301
<b>2,5 mg/ml</b>	0,365	0,381	0,384	0,379	0,395	0,39	0,378	0,394	0,396	0,391	0,404

<b>Tabla Suplementaria 3 (continuación). Detalle de las densidades ópticas para las diferentes concentraciones de B.S.A. mediante el método de Biuret</b>									
<b>B.S.A.</b>	<b>Densidades ópticas</b>							<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>		
<b>0,0 mg/ml</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>0,1 mg/ml</b>	0,036	0,101	0,132	0,097	0,038	0,046	0,041	0,06238889	0,03388413
<b>0,5 mg/ml</b>	0,116	0,156	0,158	0,133	0,105	0,152	0,151	0,12561111	0,0197994
<b>1,0 mg/ml</b>	0,303	0,162	0,171	0,151	0,306	0,303	0,319	0,22827778	0,07387016
<b>2,5 mg/ml</b>	0,401	0,4	0,39	0,384	0,401	0,4	0,4	0,39072222	0,01043076

<b>Tabla Suplementaria 4. Determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Biuret</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Réplicas</b>			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>FICINA</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,209	0,233	0,222	0,232
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	10,9349593	12,5609756	11,8157182	12,4932249
<b>PAPAÍNA</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,082	0,085	0,081	0,08
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	23,3062331	25,3387534	22,6287263	21,9512195
<b>BLPN10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,301	0,294	0,309	0,322
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	171,680217	166,937669	177,100271	185,907859
<b>BLPN10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,305	0,317	0,298	0,302
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	174,390244	182,520325	169,647696	172,357724
<b>BLPD10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,316	0,292	0,326	0,306
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	181,842818	165,582656	188,617886	175,067751
<b>PLoN09 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,239	0,247	0,245	0,249
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	129,674797	135,094851	133,739837	136,449864
<b>PLoA10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	0,308	0,306	0,294	0,281
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	176,422764	175,067751	166,937669	158,130081



<b>Tabla Suplementaria 4 (continuación). Determinación de la cantidad de proteínas totales mediante el método de Biuret</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Réplicas</b>		<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
		<b>5</b>	<b>6</b>		
<b>FICINA</b>	<i>Absorbancia</i>	0,219	0,22	<b>0,2225</b>	0,00896103
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	11,6124661	11,6802168	<b>11,8495935</b>	0,60711563
<b>PAPAÑA</b>	<i>Absorbancia</i>	0,078	0,083	<b>0,0815</b>	0,00242899
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	20,596206	23,9837398	<b>22,9674797</b>	1,64565824
<b>BLPN10 1/100</b>	<i>Absorbancia</i>	0,312	0,329	<b>0,31116667</b>	0,01295248
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	179,132791	190,650407	<b>178,568202</b>	8,77539108
<b>BLPN10 1/100</b>	<i>Absorbancia</i>	0,307	0,308	<b>0,30616667</b>	0,00643169
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	175,745257	176,422764	<b>175,180668</b>	4,35751515
<b>BLPD10 1/100</b>	<i>Absorbancia</i>	0,292	0,326	<b>0,30966667</b>	0,01556492
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	165,582656	188,617886	<b>177,551942</b>	10,5453373
<b>PLoN09 1/100</b>	<i>Absorbancia</i>	0,242	0,256	<b>0,24633333</b>	0,00592171
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	131,707317	141,192412	<b>134,64318</b>	4,01199964
<b>PLoA10 1/100</b>	<i>Absorbancia</i>	0,292	0,297	<b>0,29633333</b>	0,00989276
	<i>Concentración (mg/ml)</i>	165,582656	168,97019	<b>168,518519</b>	6,70241077

<b>Tabla suplementaria 5. Tiempo de la actividad coagulante sobre la leche</b>					
<b>Muestras</b>	<b>1 (segundos)</b>	<b>2 (segundos)</b>	<b>3 (segundos)</b>	<b>Promedio (segundos)</b>	<b>Desviación Estándar (segundos)</b>
<b>BLPN09</b>	55,69	56,47	54,84	55,6666667	0,81525047
<b>BLPN10</b>	57,99	58,42	56,04	57,48333333	1,2683191
<b>BLPD10</b>	57,68	56,07	55,76	56,50333333	1,03074407
<b>PLoN09</b>	50,78	51,94	49,99	50,90333333	0,98083298
<b>PLoA10</b>	76,01	75,29	76,96	76,0866667	0,83763556

**Tabla Suplementaria 6. Detalle de las densidades ópticas para las diferentes concentraciones de ficina mediante el método de la azocaseína para la cuantificación de la actividad proteolítica**

<b>Actividad</b>	<b>Densidades ópticas</b>						<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>		
<b>0,10 U/ml</b>	1,366	1,317	1,365	1,379	1,366	1,287	<b>1,34666667</b>	0,0362473
<b>0,12 U/ml</b>	1,417	1,384	1,481	1,482	1,512	1,461	<b>1,45616667</b>	0,04725851
<b>0,14 U/ml</b>	1,513	1,625	1,583	1,546	1,668	1,58	<b>1,58583333</b>	0,05517034
<b>0,16 U/ml</b>	1,665	1,595	1,697	1,543	1,557	1,751	<b>1,63466667</b>	0,08288225
<b>0,18 U/ml</b>	1,564	1,828	1,696	1,569	1,656	1,724	<b>1,67283333</b>	0,10014073
<b>0,20 U/ml</b>	1,741	1,644	1,68	1,827	1,784	1,771	<b>1,74116667</b>	0,06822732

<b>Tabla Suplementaria 7. Detalle de la cuantificación de la actividad proteolítica determinada por el método de la azocaseína</b>							
<b>Muestras</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Réplicas</b>					
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>FICINA</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,943	1,975	1,923	1,997	1,974	1,961
	<i>Actividad (U/ml)</i>	24,80263	25,64474	24,27632	26,22368	25,61842	25,27632
<b>PAPAÍNA</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,229	1,225	1,208	1,215	1,224	1,234
	<i>Actividad (U/ml)</i>	60,13158	59,07895	54,60526	56,44737	58,81579	61,44737
<b>BLPN09 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,324	1,345	1,386	1,367	1,372	1,396
	<i>Actividad (U/ml)</i>	8,513158	9,065789	10,14474	9,644737	9,776316	10,40789
<b>BLPN10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,416	1,424	1,406	1,411	1,422	1,397
	<i>Actividad (U/ml)</i>	10,93421	11,14474	10,67105	10,80263	11,09211	10,43421
<b>BLPD10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,401	1,368	1,37	1,398	1,363	1,341
	<i>Actividad (U/ml)</i>	10,53947	9,671053	9,723684	10,46053	9,539474	8,960526
<b>PLoN09 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,285	1,306	1,288	1,301	1,286	1,362
	<i>Actividad (U/ml)</i>	7,486842	8,039474	7,565789	7,907895	7,513158	9,513158
<b>PLoA10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,252	1,256	1,238	1,237	1,298	1,251
	<i>Actividad (U/ml)</i>	6,618421	6,723684	6,250	6,223684	7,828947	6,592105

<b>Tabla Suplementaria 7 (continuación). Detalle de la cuantificación de la actividad proteolítica determinada por el método de la azocaseína</b>						
<b>Muestras</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Réplicas</b>			<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
		<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>		
<b>FICINA</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,878	1,895	1,879	<b>1,9361111</b>	<b>0,04447</b>
	<i>Actividad (U/ml)</i>	23,09211	23,53947	23,11842	<b>24,621345</b>	<b>1,17035</b>
<b>PAPAÍNA</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,201	1,191	1,183	<b>1,2122222</b>	<b>0,01773</b>
	<i>Actividad (U/ml)</i>	52,76316	50,13158	48,02632	<b>55,716374</b>	<b>4,66461</b>
<b>BLPN09 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,361	1,348	1,366	<b>1,3627778</b>	<b>0,02179</b>
	<i>Actividad (U/ml)</i>	9,486842	9,144737	9,618421	<b>9,5336257</b>	<b>0,573355</b>
<b>BLPN10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,406	1,417	1,408	<b>1,4118889</b>	<b>0,00865</b>
	<i>Actividad (U/ml)</i>	10,67105	10,96053	10,72368	<b>10,826023</b>	<b>0,22769</b>
<b>BLPD10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,426	1,372	1,389	<b>1,3808889</b>	<b>0,02518</b>
	<i>Actividad (U/ml)</i>	11,19737	9,776316	10,22368	<b>10,010234</b>	<b>0,662673</b>
<b>PLoN09 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,332	1,374	1,375	<b>1,3232</b>	<b>0,03827</b>
	<i>Actividad (U/ml)</i>	8,723684	9,828947	9,855263	<b>8,4926901</b>	<b>1,00714</b>
<b>PLoA10 1/100</b>	<i>Densidad óptica</i>	1,245	1,263	1,206	<b>1,25</b>	<b>0,02446</b>
	<i>Actividad (U/ml)</i>	6,434211	6,907895	5,407895	<b>6554,09</b>	<b>0,643677</b>

<b>Tabla suplementaria 8. Actividad proteolítica específica de <i>Ficus</i> spp.</b>			
<b>Muestras</b>	<b>Actividad (U/ml)</b>	<b>Proteínas totales (mg/ml)</b>	<b>Actividad específica</b>
<b>FICINA</b>	24,6213	11,85	2,07774684
<b>PAPAÍNA</b>	55,7164	22,97	2,42561602
<b>BLPN09</b>	9,5336	178,57	0,05338859
<b>BLPN10</b>	10,826	175,18	0,06179929
<b>BLPD10</b>	10,0102	177,55	0,05637961
<b>PLoN09</b>	8,4927	134,64	0,06307709
<b>PLoA10</b>	6,5541	168,52	0,03889212