



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuela de Formación Profesional
de Biología.

**IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS DE LA VÍA SMIRNOFF–WHEELER EN HOJAS Y
FRUTOS DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh “camu camu”**

TESIS

INFORME DE SERVICIOS PROFESIONALES

Requisito para optar el título profesional de

BIÓLOGO

Autor:

FREDDY GUTIERREZ RODRIGUEZ

IQUITOS – PERÚ

2014

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR

.....

Blgo. Jorge Luís Marapara del Águila, Dr.

Presidente

.....

.....

Blgo. Marcelino Adrianzén Julca, M.Sc.

Miembro

Blgo. Jorge Angulo Quintanilla.

Miembro

ASESORES

.....

Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.

Asesor

.....

Blgo. Roberson Ramírez Saavedra.

Asesor



UNAP

**Dirección de Escuela
Profesional de
Biología - FCB**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Iquitos, 24 de setiembre de 2012



En la ciudad de Iquitos, a los veinticuatro (24) días del mes de setiembre de 2012 y, siendo las 16.05 horas; se reunió en la sala de exposiciones del SECEDO-UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de Tesis que suscribe, designado con RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 012-2012-DEFP-B-UNAP, presidido e integrado por **Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr., Presidente; Blgo. JORGE ANGULO QUINTANILLA, Miembro; y Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZEN JULCA, M.Sc., Miembro;** para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: **"IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS DE LA VÍA DE SMIRNOFF-WHEELER EN HOJAS Y FRUTOS DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh "camu camu"** realizado por el bachiller en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Biología: **FREDDY GUTIERREZ RODRIGUEZ** de la Promoción II-2010, graduado de bachiller con RESOLUCIÓN RECTORAL N° 0827-2012UNAP, de fecha 24 de abril de 2012; figurando como asesores: **Dr. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ** y **Blgo. ROBERSON RAMÍREZ SAAVEDRA.**



Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño del bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dio como veredicto que **LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS HA SIDO CALIFICADA COMO: MUY BUENA**; quedando en consecuencia el candidato apto para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 17.10 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de Sustentación por triplicado.

Jorge Luis Marapara-Del Águila
PRESIDENTE

Jorge Angulo Quintanilla
MIEMBRO

Pedro Marcelino Adrianzen Julca
MIEMBRO

DEDICATORIA

A mi madre Sandrith Rodríguez Celis la mujer más honesta, trabajadora pero más que toda una gran persona ya que siempre ha podido salir adelante y ser triunfadora. A mi padre Joel Gutiérrez Villacorta por el apoyo incondicional, por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida.

A mi dos hermosas mujeres Evelyn Pezo Villacorta y Nayeli Gutiérrez Pezo, una que me permitió formar parte de su vida y la otra formar parte de nuestras vidas, que con los mejores sentimientos pero sobre todo, con las enseñanzas de ser feliz a pesar de las dificultades, pero que de alguna manera me ayudaron a que este gran esfuerzo sea realidad, las amo.

A mis abuelos Publio Gutiérrez Gutiérrez y Trinidad Villacorta Aspajo por la paciencia, confianza y al mismo tiempo a los regaños que me merecía y que lo entiendo ahora, por esa sabiduría que solo el tiempo te hace conocer y a tus oraciones que estoy seguro que siempre lo haces abuelita.

A mis hermanos Paul y Onelia Gutiérrez que con su paciencia y al mismo tiempo desesperada Tolerancia por ver cumplir esta meta, pero sobre todo gracias por aprender con ustedes y estar en todos los momentos difíciles pero felices en familia.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación es un esfuerzo en el cual, de forma directa o indirectamente participaron varias personas corrigiendo, opinando y dando ánimo en los momentos que en algunos casos el factor económico es una limitante, pero amigos y compañeros que siempre, siempre acompañaron en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad va dirigido.

Al grupo de investigación del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales CIRNA, por brindarme las facilidades de los ambientes y equipos para la realización del trabajo.

Al proyecto Influencia de la expresión genética y actividad catalítica de enzimas de la Vía biosintética Smirnoff – Wheeler en la variación de la producción de vitamina C en *Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh “camu camu” por el apoyo económico. Especialmente al Dr. Juan Carlos Castro Gómez investigador encargado del proyecto, por la sabiduría, por los conocimientos inculcados en mi formación profesional, por haber confiado en mí persona y por el asesoramiento incondicional. Al Blgo. Roberson Ramírez Saavedra, por las enseñanzas y paciencia para dar los pasos en el camino de la investigación. A la Blga. Marianela Cobos Ruíz por sus comentarios constructivos en todo el proceso de elaboración de la Tesis y sus atinadas correcciones.

A los coordinadores e investigadores Dr. Jorge Luis Marapara Del Águila del área de biotecnología y Blgo. Marcelino Adrianzén Julca M.Sc. del área de calidad de suelos, por las orientaciones y apoyo para la realización de la presente tesis, asimismo, docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP que inyectaron esa curiosidad de la investigación en las aulas en mi formación profesional en la universidad. Y por último pero no menos importante, Blgo. Rommel Rojas Zamora, Blgo. Julian Torres Flores, Blga. Alina Egoavil Reátegui, Br. Mery siguas salas que constituyeron el más grande equipo de trabajo que durante dos años consecutivos se lograron muchas cosas y se formaron grandes amistades y ahora a mis queridos compañeros, Alex Tapullima, Alexander Cerdeira y Cinthya Acuña que de forma incondicional apoyaron al trabajo de investigación lo cual fueron el soporte en los momentos de fatiga, cansancio y para terminar este proceso. Gracias a todos.

ÍNDICE

PORTADA	1
PÁGINA DEL JCYD	2
ASESORES	3
COPIA DEL ACTA DE SUSTENTACIÓN	4
DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS	6
INDICE	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE FOTOS	10
LISTA DE GRÁFICOS	11
LISTA DE TABLAS	12
RESUMEN	14
I. INTRODUCCION.....	16
II. ANTECEDENTES	17
III. MATERIALES Y METODOS	28
3.1 AREA DE ESTUDIO	28
3.2 COLECTA Y TRANSPORTE DEL MATERIAL BIOLÓGICO	28
3.3 METODOLOGÍA.....	29

3.3.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS TOTALES	29
3.3.2 CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO INORGÁNICO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD DE GDP- MANOSA PIROFOSFORILASA Y L-GALACTOSA 1-P- FOSFATASAS.....	30
3.3.3 EXTRACCIÓN DE LAS ENZIMAS.....	31
3.3.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LAS ENZIMAS	32
3.3.4.1 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GDP-MANOSA PIROFOSFORILASA	32
3.3.4.2 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GDP-MANOSA EPIMERASA.....	33
3.3.4.3 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GDP-L-GALACTOSA FOSFORILASA	34
3.3.4.4 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GDP-L-GALACTOSA 1-P-FOSFATASA.....	35
3.3.4.5 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE L-GALACTOSA DESHIDROGENASA	36
IV. ANÁLISIS E INTERPRETACION DE DATOS	37
V. RESULTADOS.....	38
VI. DISCUSION.....	44
VII. CONCLUSIONES.....	48
VIII. RECOMENDACIONES	49
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50
X. ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

Nº	Pag.
Fig. 1	Concentración de proteínas totales en hoja, cáscara y pulpa de los frutos de <i>M. dubia</i> 38
Fig. 2	Actividad enzimática específica de GDP-D-manosa pirofosforilasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de <i>M. dubia</i> 39
Fig. 3	Actividad enzimática específica de GDP-D-Manosa epimerasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de <i>M. dubia</i> 40
Fig. 4	Actividad enzimática específica de GDP-L-Galactosa fosforilasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de <i>M. dubia</i> 41
Fig. 5	Actividad enzimática específica de L-Galactosa 1-P-fosfatasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de <i>M. dubia</i> 42
Fig. 6	Actividad enzimática específica de L-Galactosa deshidrogenasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de <i>M. dubia</i> 43

LISTA DE FOTOS

Nº		Pag.
Foto 1.	Laboratorio de biotecnología del centro de investigaciones de recursos naturales UNAP.....	CIRNA- 59
Foto 2.	Ubicación geográfica del área de muestreo.	59
Foto 3.	Flujograma de trabajo.	79

LISTA DE GRÁFICOS

Nº	Pag.
Gráfico 1.	Curva estándar de confiabilidad para la concentración de proteínas totales por el método de Bradford a 596 nm..... 66
Gráfico 2.	Ecuación de la curva estándar de confiabilidad para calcular la concentración de fosfato inorgánico liberado de 1-10 μM 68
Gráfico 3.	Ecuación de la curva estándar de confiabilidad para calcular la concentración de fosfato inorgánico liberado de 10-100 μM 68
Gráfico 4.	Vía metabólica de Smirnoff-Wheeler en la síntesis de vitamina C (ácido ascórbico). 70

LISTA DE TABLAS

Nº	Pag.
Tabla 1. Datos de espectrofotometría de la concentración de proteínas totales en los diferentes tejidos de <i>M. dubia</i> . C (ácido ascórbico)	67
Tabla 2. Modificación de las condiciones para el protocolo realizado para el proceso de extracción de enzimas	69
Tabla 3. Pérdida de proteínas de bajo peso molecular durante el proceso de diálisis por 12 horas.....	71
Tabla 4. Comparación de la actividad específicas con otros trabajos en otras especies.....	72
Tabla 5. Análisis de variancia-ANOVA de las proteínas totales de los tejidos de <i>M. dubia</i>	74
Tabla 6. Análisis estadísticos entre la comparación de las proteínas totales de los tejidos de <i>M dubia</i>	74
Tabla 7. Análisis de variancia-ANOVA de la actividad enzimática de las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler.	75
Tabla 8. Comparación múltiple de las enzimas por tejido aplicando prueba de Tukey HSD.....	76
Tabla 9. Análisis de la actividad de las enzimas en tejidos de <i>M. dubia</i>	78

RESUMEN

La vitamina C es un nutriente esencial para el hombre y una de sus fuentes naturales son los frutos de *Myrciaria dubia*, sin embargo, esta planta muestra amplia variación en el contenido de vitamina C. Para ayudar a esclarecer las bases bioquímicas de esta variación, se planteó como objetivo identificar enzimas de la vía Smirnoff–Wheeler en hojas y frutos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh “camu camu”. Para ello las muestras de *M. dubia* fueron obtenidos de la colección de germoplasma del Instituto Nacional de Innovación Agraria, donde se extrajo y purificó parcialmente las proteínas totales en base a un protocolo modificado. Las proteínas totales se cuantificaron con el método colorimétrico de Bradford y la actividad de las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler se determinaron mediante espectrofotometría y HPLC. Lo cual se logró extraer y purificar parcialmente las proteínas totales para luego obtener las enzimas de la vía Smirnoff–Wheeler de hojas, cáscara y pulpa de *M. dubia* a través del proceso de diálisis. La concentración de proteínas totales que se obtuvo de la extracción fue mayor en las hojas ($0,360 \pm 0,023$ mg/ml) con respecto a la cáscara ($0,175 \pm 0,028$ mg/ml) y pulpa ($0,033 \pm 0,001$ mg/ml). Asimismo, las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler en los tres tejidos analizados se lograron identificar a cinco de las seis enzimas, siendo predominantemente mayor la actividad de las enzimas GDP-D-manosa pirofosforilasa, GDP-D-Manosa epimerasa, GDP-L-Galactosa fosforilasa y L-Galactosa-1-fosfato fosfatasa, el tejido que frecuentemente presentó la mayor

actividad de la mayoría de las enzimas fue en el tejido de la pulpa y menor actividad en los demás tejidos. Estos resultados nos indican que los tres tejidos analizados tienen capacidad de realizar la biosíntesis de vitamina C, asimismo, se muestra que existen diferencias en la actividad de varias de las enzimas de Smirnoff-Wheeler al comparar entre los tejidos analizados de *M. dubia*. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico IBM SPSS v 19.

Palabras clave: *Myrciaria dubia*, Smirnoff-Wheeler, biosíntesis, vitamina C, vía metabólica, enzimas.

I. INTRODUCCIÓN

La amazonia alberga una vasta riqueza de ecosistemas y especies. Sus bosques son los más biodiversos del planeta y representan una fuente rica de recursos genéticos. Por tanto, posee importantes potenciales económicos para la sostenibilidad de la población local (Gentry 1993, Kalliola 1993).

Entre estos recursos de la biodiversidad amazónica, tenemos a *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh “camu camu”, frutal nativo que se encuentra en estado silvestre en el Perú, Brasil, Colombia, Venezuela y Ecuador (Iman 2000). Este arbusto tiene gran importancia nutricional porque sus frutos presentan altas concentraciones de vitamina C (ácido L-ascórbico), que se encuentran de 650 a 3133 mg vitamina C/100 g de pulpa fresca (Pinedo *et al.* 2002, Castro *et al.* 2011). Esta vitamina cumple papeles importantes en los organismos porque elimina radicales libres, es precursor para la biosíntesis de colágeno, y compuestos bioactivos, mantiene el estado redox funcional de los cofactores metálicos y permite la extensión de la pared celular (Conklin *et al.* 1999, Chotani *et al.* 2000).

A pesar de la importancia del camu camu por su capacidad de producir abundante vitamina C, aun son escasos los estudios bioquímicos de la vía metabólica responsable de su biosíntesis. Investigaciones del metabolismo biosintético de vitamina C realizados por Wheeler *et al.* (1998), demuestran que la conversión enzimática de GDP-D-Manosa a ácido L-ascórbico es la ruta

metabólica para la biosíntesis de vitamina C en *Arabidopsis thaliana*. En esta vía de Smirnof-Wheeler, que es considerada la principal ruta metabólica para la biosíntesis de vitamina C en plantas, participan seis enzimas: GDP-Manosa Pirofosforilasa, GDP-Manosa Epimerasa, L-Galactosa fosforilasa, L-Galactosa-1-Fosfato Fosfatasa, L-Galactosa deshidrogenasa y la L-Galactono-1,4-Lactono Deshidrogenasa (Smirnof *et al.* 2001).

Por tanto, para contribuir al conocimiento del metabolismo de vitamina C en el camu camu, se planteó como objetivo general de esta investigación Identificar enzimas de la vía Smirnof-Wheeler en hojas y frutos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh "camu camu", para ello se estandarizó la extracción de enzimas de la vía Smirnof-Wheeler, se cuantificaron las proteínas totales, se midió y se comparó la actividad enzimática de la vía Smirnof-Wheeler en hoja, cáscara y pulpa de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh "camu camu".

II. ANTECEDENTES

Torabinejad *et al.* (2009), concluyeron en hojas de *Actinidia deliciosa* (kiwi) la enzima GDP-L-Galactosa 1 fosfato fosfatasa (VTC4), tiene una similitud con la enzima Myo-inositol monofosfatasa (IMP), demostrando la hidrolisis del sustrato L-galactosa 1-fosfato (L-Gal 1-P), lo que sugiere que esta enzima puede ser bifuncional y ligado con dos posibles vías en la síntesis de vitamina C. asimismo, compararon con los sustratos L-Gal 1-P y D-myo-inositol 3-fosfato a través de cinética enzimática, mostrando sólo una pequeña diferencia en la actividad específica de 4,0 nmol. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína para D-myo-inositol 3-fosfato y L-galactosa 1-fosfato 5,4 nmol. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína.

Linster *et al.* (2008), analizaron la enzima GDP-L-galactosa fosforilasa (VTC2) mostrando que exhibe especificidad por GDP-L-galactosa. La naturaleza exacta de la reacción catalizada por esta enzima sin embargo aún nos es clara la naturaleza exacta de la reacción catalizada por esta enzima, debido a que también utilizan hexosas-1- fosfato como sustrato fosforolíticos. Además, demostraron que en *Arabidopsis* la enzima mutante (VTC5) cataliza eficientemente la conversión de GDP-L-galactosa a L-galactosa 1-fosfato. También encontraron que el k_m de la enzima nativa fue mayor ($0,0079 \pm 0,0011 \mu\text{M}$) que de la mutante ($0,0044 \pm 0,0016 \mu\text{M}$).

Ishikawa y Shigeoka (2008), mencionaron que hay evidencias genéticas convincentes que la biosíntesis de vitamina C procede de la vía D - Manosa/L-galactosa y es la fuente más significativa de esta vitamina en plantas. La vitamina C desempeña papeles importantes como antioxidante de la célula, particularmente de este ciclo. Donde la ascorbato peroxidasa se desempeña como enzima dominante en metabolismo celular del peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

Imai *et al.* (2008), analizaron la expresión de seis genes relacionados a la vía Smirnoff-Wheeler en la pulpa del melocotón, dividiendo en cuatro fases basadas en el contenido total de vitamina C, encontrando la más alta concentración en la floración (21 días) de 2-3 μmol por peso fresco de fruto, el cual indica una alta demanda metabólica y consumo de vitamina C en pulpa de melocotón al suministrar varios precursores. Los genes estudiados que expresan D-Manosa pirofosforilasa, GDP-D- Manosa 3', 5' epimerasa, GDP-L-galactosa guaniltransferasa, L-galactosa-1-fosfato fosfatasa, L-galactosa deshidrogenasa y de L-galactono 1,4-lactona deshidrogenasa. D-Manosa pirofosforilasa, GDP-D-Manosa 3', 5' epimerasa y GDP-L-galactosa guaniltransferasa tenía patrones similares de la expresión que determinaron en 43 días. L- galactosa 1-fosfato fosfatasa, L-galactosa deshidrogenasa y L-galactono 1,4 lactono deshidrogenasa, también tuvo patrones similares de la expresión que determinaron en dos evaluaciones en 21 y 91 días, aunque la expresión de L-Galactosa deshidrogenasa era absolutamente baja.

Dowdle *et al.* (2007), demostraron que las plantas sintetizan vitamina C (ácido L-ascórbico) a partir de guanosina manosa difosfato mediante la vía de L-galactosa/L-gulosa demostrando que una fosforilasa GDP-galactosa es codificada por el gen VTC2 que expresa la enzima GDP-L-Galactosa fosforilasa en *Arabidopsis thaliana* y un homólogo del gen VTC2 que codifica a otra fosforilasa con propiedades similares. Asimismo determinaron la velocidad de reacción de las enzimas que participan en la síntesis de vitamina C en plantas aclimatadas a la intensidad de luz baja y luz alta en *Arabidopsis thaliana*, obtuvieron las velocidades y las actividades específicas de mayor reacción en intensidad de luz alta como para la GDP-Manosa pirofosforilasa de $6,6 \pm 1,2$; GDP-Manosa 3,5-epimerase $0,11 \pm 0,01$; GDP-L-galactosa fosforilasa $12,4 \pm 1,7$; L-Galactosa 1-P fosfatasa 140 ± 10 ; L-Galactosa deshidrogenasa $8,0 \pm 1,0$ y L-Galactono 1,4 Lactono deshidrogenasa de 210 ± 30 nmol sust. /mg proteína/ minuto.

Laing *et al.* (2007). Identificaron una enzima para la formación de GDP-D-manosa a GDP-L-Galactosa mediante un proceso de epimerización a través de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en hojas de *Actinidia chinensis* (Kiwi). Asimismo utilizaron en los ensayos aceptores guanilo potenciales, utilizando concentraciones variables de fosfato inorgánico, pirofosfato inorgánico, y D-manosa-1-P. asimismo, la enzima GDP-D-manosa epimerasa mostró una actividad específica de $0,12 \pm 0,03$ para el fosfato, $0,032 \pm 0,02$ para pirofosfato y $0,17 \pm 0,01$ nmol $\text{seg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de proteína para D-manosa-1-P

respectivamente. Al igual determinaron los valores de K_m que fueron de $4,4 \pm 2,0$; $16 \pm 0,05$ y $0,11 \pm 0,03$ mM.

Leferink *et al.* (2007), determinaron que la L-Galactono-1,4 lactono deshidrogenasa es una enzima mitocondrial que cataliza el paso final en la biosíntesis de la vitamina C (ácido ascórbico) en hojas de *Arabidopsis thaliana* que determinaron el K_m de 13,1 mmol utilizando citocromo c como aceptor de electrones y una velocidad de reacción específica de 4,0 U/mg proteína/segundo. Demostrando diferencias notables de la L-galactono 1,4 lactono y L-gulono 1,4 lactono lo cual es caracterizada en la biosíntesis de vitamina C (ácido L-ascórbico).

Roselló (2007), indicó la mejora basada en la transformación de plantas de tomate mediante introducción de genes foráneos para incrementar la síntesis de antioxidantes que se apoya fundamentalmente en el conocimiento en la vía Smirnoff-wheeler para desarrollar una mayor resistencia a diferentes factores metabólicos del tomate.

Hancock y Viola (2005), Mencionaron que existen tres vías en las plantas para la formación de vitamina C, que surge a partir de GDP-manosa, myo-inositol y ácido galacturónico, este último derivado de la descomposición de la pectina durante

las últimas etapas de la maduración de frutas que realizaron en fresa y las dos primeras vías se realizaron en *Arabidopsis thaliana*.

Laing *et al.* (2004), purificaron parcialmente la enzima L-galactosa-1-fosfato fosfatasa en hojas de *Actinidia deliciosa* (kiwi) y *Arabidopsis thaliana*, identificando a la enzima con un peso molecular de 65 KDa, el cual fue completamente dependiente de Mg^{2+} para la actividad, asimismo, a concentraciones mayores de 0,2 mM de Mg^{2+} la enzima fue inhibida. La actividad específica mostrada por la enzima en *Actinidia deliciosa* fue de 0,220 y para *Arabidopsis thaliana* 0,163 nmol/min/mg de proteína.

Laing *et al.* (2004), purificaron la enzima L-galactosa deshidrogenasa en hojas de *Actinidia deliciosa* (kiwi), la enzima tuvo un peso molecular de 34,2 KDa y K_m (NAD) de $0,078 \pm 0,01$ mM el mismo que disminuyo a medida que el pH se incrementaba a partir de 6,5 a 9, mientras que en el volumen máximo aumentaba, asimismo utilizaron varios azúcares como sustratos o inhibidores alternativos, siendo la glucosa el mejor sustrato para la enzima. La inactivación al parecer ocurría a nivel del sitio-activo de la enzima la cual fue protegida por el sustrato NAD, y no por NADH, los niveles de la actividad catalítica de L-Galactosa deshidrogenasa tuvieron una actividad específica de reacción de $11,5 \pm 0,4$ U/minuto/ml de proteína.

Valpuesta y Botella (2004), mencionaron que el camino biosintético del ácido ascórbico en plantas se ha establecido por varios años. Sin embargo, las investigaciones recientes describen caminos alternativos, donde revela un cuadro más complejo de la biosíntesis de vitamina C o ácido ascórbico. La GDP-L-gulosa y el myo-inositol donde propone como nuevos intermediarios en la biosíntesis de vitamina C, indicando que el camino animal pudo también funcionar en plantas. Asimismo estudios enzimáticos revela que GDP-Manosa 3, 5 epimerase y la L-galactono 1,4-lactono deshidrogenasa sugiere que son pasos reguladores importantes para biosíntesis de vitamina C.

Mieda *et al.* (2004), han estudiado las propiedades enzimológicas de L-galactosa deshidrogenasa (L-GalDH) en las hojas de espinaca. Demostrando que la enzima es un homodímero con un peso molecular de 36 KDa. Codificando una lectura abierta 322 residuos de aminoácidos con un peso molecular calculado de 35,261 Da. La secuencia de aminoácidos deducida del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) mostró homología del 82, 79 y 75% en *Actinidia chinensis* (kiwi), *Malus sylvestris* (manzana) y *Arabidopsis thaliana* respectivamente. El material purificado L-Galactosa deshidrogenasa mostró alta especificidad para la L-galactosa con un constante de Michelle (Km) de $116,2 \pm 3,2$ mM curiosamente la enzima L-GalDH exhibió una inhibición reversible por ácido ascórbico el producto final de la ruta biosintético de vitamina C donde calcularon la cinética de inhibición (Ki) de $133,2 \pm 7,2$.

Hancock *et al.* (2003), proporcionaron la evidencia de la presencia de vitamina C, en la savia del líber o floema de una amplia gama de cosechas de especies usando pruebas histoquímicas. La actividad de casi todas las enzimas de la biosíntesis de vitamina C (ácido L-ascórbico) fue detectado en exudados vasculares del líber de las frutas a través de protocolos de extracción y purificación de Cucurbita, la biosíntesis de vitamina C fueron demostradas en filamentos aislados del líber de peciolo de los graveolens de Apio, incubados con varios precursores (D-glucosa, D-Manosa, L-galactosa y L-galactono-1,4-lactona). Demostrando que las enzimas están presentes con una actividad específica en nmol sust/mg prot/minuto, las cuales fueron, para GDP Manosa 3,5-epimerase $0,07 \pm 0,01$ en el floema y $0,12 \pm 0,02$ tejidos vasculares, GDP D-Manosa fosforilasa $22,8 \pm 1,56$ en el floema; GDP-L-galactosa 1-P fosfatasa $0,012 \pm 0,02$ en el floema, L-galactosa deshidrogenasa con $28,0 \pm 0,46$ en el floema y $7,0 \pm 1,27$ para tejidos vasculares, y L-Galactono 1,4 lactono $1,98 \pm 0,18$ solo en tejidos vasculares.

Gatzek *et al.* (2002), han purificado la enzima que oxida a L-galactono-1,4-Lactona de plantas de guisantes, clonado a partir de *Arabidopsis thaliana*. La enzima L-Galactosa deshidrogenasa en la biosíntesis de vitamina C fue investigado por la sobreexpresión del tabaco y la respuesta contraria en *A. thaliana*. En tabaco, obtuvieron la más alta expresión la cual tuvo un aumento de 3.5 veces en actividad solamente extraídas las proteínas de las hojas, pero esto

no aumentó la concentración de vitamina C en el tejido mencionado. Sin embargo en *Arabidopsis thaliana* transformando a través de clonación la (L-GalDH), obtuvieron una producción del 30% más de la actividad de tipo nativo. Las cuales fueron la actividad catalítica específica en condiciones de luz baja de $165 \pm 13,5$ pmol/min/mg proteína y $170 \pm 18,9$ pmol/min/mg proteína en concentraciones de luz alta. Estas tuvieron una mayor concentración de vitamina C en la hoja cuando se cultivan bajo condiciones de luz alta.

Wolucka *et al.* (2001), han purificado parcialmente la enzima GDP-D-Manosa 3,5 epimerasa en *Arabidopsis thaliana*, asimismo a través del método electroforético obtuvieron una masa molecular de 84 KDa. La purificación de la enzima lo realizaron utilizando resina de intercambio iónico Blue-Sepharose eluida con NAD, mostrando a través del método de cromatografía líquida (HPLC) una alta actividad específica de 13600 unid/mg proteína/minuto y la baja actividad específica del 55 al 70% de saturación con sulfato de amonio de 206 unid/mg proteína/minuto.

Smirnoff (2000), sostiene que la vitamina C es sintetizado a partir de la Manosa guanosina difosfato por la vía L-galactono y L-galactono 1,4 lactono, este último siendo catalizado por L-galactono 1,4 lactono deshidrogenasa. Por otro lado mencionaron que esta enzima está localizada en el interior de la membrana mitocondrial donde utiliza como aceptor de electrones el citocromo C. esta

oxidación de L-galactono 1,4 lactono acelera su proceso en hojas tiernas y aclimatadas a una alta incidencia de luz.

Smirnoff y Wheeler (2000), han determinado un camino para la biosíntesis de vitamina C (ácido ascórbico) donde participan seis enzimas sintetizando cada una de ellas sus respectivos sustratos los cuales fueron determinados con la formación de GDP-Manosa, GDP-L-Galactosa, L-Galactosa 1-P, L-galactosa, L-galactono 1,4 lactono y L-ascorbato en mutantes de *Arabidopsis thaliana*.

Imai *et al.* (1999), purificaron parcialmente la enzima L-Galactono-1,4-lactono deshidrogenasa (GLDHase) de las mitocondrias de raíces tuberosas del camote, obteniendo un peso aproximadamente de 56 KDa en un gel SDS-PAGE. Asimismo evaluaron la actividad específica de la enzima obteniendo 0,070 unid/mg proteínas/minuto. Las secuencias de los nucleótidos fueron utilizadas para la amplificación del fragmento ADNc de 581 residuos de aminoácidos, comparando la secuencia de los aminoácidos con la coliflor y una levadura. Demostrando una identidad del 77% con la del coliflor y un 22% de homología con la enzima L-galactono-1,4 lactono deshidrogenasa de la levadura a pesar de la diferencia de sustrato, estas enzimas están implicadas dentro de la biosíntesis de vitamina C (ácido L-ascórbico).

Wheeler *et al.* (1998), evaluaron una vía metabólica en la síntesis de vitamina C o ácido ascórbico en plantas guisante y *Arabidopsis thaliana* encontrando en las concentraciones hasta 25 mM en los cloroplastos. Posiblemente tiene un papel en la fotosíntesis y el transporte de electrones. Asimismo determinaron que D-Manosa y la L-galactosa son precursores eficientes para la síntesis de vitamina C (ácido L-ascórbico). Siendo de nexos de estos dos sustratos la enzima GDP-D-manosa 3,5 epimerasa, por otro lado identificaron una enzima la L-galactosa deshidrogenasa, que cataliza la oxidación de la L-galactosa a L-galactono-1,4-lactono. Lo cual propone un camino de la biosíntesis de vitamina C (ácido L-ascórbico) que implica GDP-D-Manosa formada a partir de D-Manosa 1-fosfato, se convierte en GDP-L-galactosa; posteriormente a L-galactosa 1-fosfato; L-galactosa; L-galactono-1,4-lactona; y finalmente vitamina C o L-ascorbato.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Área de estudio

El trabajo se realizó en el Departamento de Loreto, provincia de Maynas, distrito de Iquitos, según el SENAMHI su ubicación geográfica: se encuentra a una altitud de 124.4 m.s.n.m y una latitud sur de 03°45'05,865" y latitud oeste 73°14'40,970" ubicada en la región oriental del Perú.

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), situada en el pasaje los pajiles S/N, AA.HH Nuevo San Lorenzo situado en la ciudad de Iquitos, distrito de San Juan Bautista, Km 2,0 de la carretera Abelardo Quiñones (Ver anexo 1).

3.2. Colecta y transporte del material Biológico

Las hojas y frutos obtenidos corresponden a 43 accesiones representativas de la variabilidad genética de esta especie, pertenecientes a 8 principales cuencas hidrográficas de la Región Loreto (Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre, Amazonas). Las accesiones se encuentran en el campo Experimental "El Dorado" del Instituto Nacional de Innovación Agraria,

ubicado en el Km 25½ de la carretera Iquitos – Nauta. Las coordenadas geográficas son 03° 57' 17" LS y 73° 24' 55" LO a 112 m.s.n.m (ver anexo 2).

Para la colecta del material botánico se seleccionó al azar tres plantas en fructificación y con una tijera podadora se obtuvieron por triplicado hojas y frutos en buen estado. El material colectado se almacenó en un termo con hielo para luego ser llevados a las instalaciones del laboratorio de biotecnología del CIRNA-UNAP para sus respectivos análisis (ver equipos, materiales y reactivos empleados en anexo 3)

3.3. Metodología

3.3.1. Cuantificación de proteínas totales

Se realizó en base al método colorimétrico de Bradford (1976). Primero se elaboró una curva estándar con diferentes concentraciones de Albumina de Suero Bovino (BSA) desde 1 a 0,0625 mg/ml de concentración. Para ello se diluyó 1 mg de BSA enrazado con 1 ml de agua ultrapura en diferentes tubos de 1,5 ml a todos los estándares, seguidamente se añadió 1 ml del reactivo de Bradford (azul de comassie G-250 117 µM, 20% etanol absoluto y 5% ácido orto fosfórico), 50 µl de hidróxido de sodio a 1 M y 20 µl de los estándares, dejando en incubación por 20 minutos, luego se realizó la lectura a 596 nm en un espectrofotómetro UV/luz visible. Luego con los datos

de absorbancia se elaboró la curva, donde se obtuvo la ecuación (ver anexo 4).

Para la determinación de las proteínas totales, se procedió a tomar 20 μl de las proteínas obtenidas en la extracción y purificación parcial, extraídas de los tejidos (hoja, cáscara y pulpa) luego se colocaron en microtubos de 1,5 ml con 1 ml del reactivo de Bradford, 50 μl de NaOH 1 M y 20 μl de extracto de los tejidos. Estos componentes se mezclaron en el vortex por 30 seg e incubaron por 20 min a 30°C. Luego se midió la absorbancia a 596 nm en un espectrofotómetro UV/Visible. Con los datos obtenidos en dicha lectura se calculó la concentración de proteínas totales presentes en los tejidos, reemplazándolas en la ecuación generada por la curva estándar (ver anexo 5).

3.3.2. Cuantificación de fosfato inorgánico para evaluar la actividad de GDP-Manosa pirofosforilasa y L-galactosa 1-P-fosfatasa.

Se realizó en base al método colorimétrico con verde de malaquita elaborado por González *et al.* (1992), el cual consistió en la mezcla de los reactivos de oxalato de verde de malaquita 3 mM, molibdato de sodio 80 mM, 0,5% de Triton X-100 y ácido clorhídrico 0,7 M. seguidamente se realizó una serie de diluciones del fosfato de potasio monohidratado para la elaboración de una curva estándar. Para ello se agregó 500 μl del reactivo de verde de malaquita, 10 μl de fosfato

de las concentraciones conocidas y 450 μ l de agua, dejando en incubación por 20 min. Luego se procedió a leer a una longitud de onda de 624 nm en un espectrofotómetro UV/luz visible (ver anexo 6). Asimismo, se emplearon controles negativos que consistieron en el reactivo de verde de malaquita y los extractos de los diferentes tejidos ebullidos por 10 min, para todos los ensayos. Con los datos obtenidos en la lectura se calculó la concentración de la liberación de fosfato inorgánico presentes en la muestra.

3.3.3. Extracción de las enzimas

Se realizó según Gatzek *et al.* (2002), Hancock *et al.* (2003) y Conklin *et al.* (2006), los mismos que sufrieron modificaciones en las etapas de centrifugación, concentraciones y se incluyó una etapa de diálisis (ver anexo 7). Para ello se pesó 1,5 g de la muestra (hojas, pulpa y cáscara) y luego a cada una de ellas se le agregó 5 ml de Tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH: 7,5, Cloruro de magnesio 1 mM, Ácido etilendiaminotetraacético EDTA 2 mM, Ditriitol 3 mM, Ácido aminocaproico 1 mM, benzamedina hidrocloreuro 1 mM, Fluoruro fenilmetilsulfonil 1 mM, Polivinilpirrolidona 3,0% y glicerol 20%), y se trituroó con morteros y pilones estériles, el homogenizado se filtró con dos capas de muselina, el filtrado obtenido se centrifugó a 15000 rpm a 4°C por 15 min. El sobrenadante obtenido pasó a ser dializado por una membrana de diálisis (MWCO 6,000-8,000

FisherBrand) con 500 ml de tampón de diálisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y Ditolreitol 1 mM) durante 12 horas a una temperatura de 4°C. El dializado recuperado se centrifugó a 15000 rpm a 4°C por 5 min y se almacenó en alícuotas de 100 µl a -20°C.

3.3.4. Determinación de la actividad catalítica de las enzimas

Se midió la actividad catalítica de cinco enzimas de la vía Smirnov-Wheeler (ver anexo 8).

3.3.4.1. Actividad enzimática de GDP-Manosa pirofosforilasa (GMP)

El ensayo enzimático se realizó en base a Davis *et al.* (2004). Para ello se agregó en microtubos, 90 µl del Tampón de reacción GMP (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Cloruro de magnesio 8 mM, Guanosina trifosfato GTP 100 µM, Manosa-1-fosfato 100 µM, Ditolreitol 1 mM, pirofosfatasa inorgánica 0,01 U/µl) y 10 µl del extracto enzimático. Los componentes se homogenizaron e incubaron a 30°C por 1 hora. La reacción se detuvo incubando las muestras a 95 °C por 10 min. Todos los ensayos se realizaron empleando un control negativo (extracto enzimático hervido por 10 min). Después de inactivar las muestras se procedió a determinar el fosfato inorgánico en los controles negativos y muestras evaluadas de acuerdo a González *et al.* (1992). Para ello se agregó a la reacción 400 µl de agua y 500 µl del reactivo de verde de

malaquita donde se leyó en un espectrofotómetro de luz UV/luz visible a una longitud de onda de 624 nm.

3.4.4.2 Actividad enzimática de GDP- Manosa epimerasa (GME)

La reacción se realizó de acuerdo a Major *et al.* (2005). Para ello se mezclaron 90 μ l de los siguientes componentes de Tampón de reacción GME (Tris-HCl 50mM pH 8, Ácido etilendiaminotetraacético 10 mM, GDP-D-Manosa 100 μ M), 10 μ l del extracto enzimático y agua en un volumen de reacción total de 500 μ l. Los componentes se homogenizaron en un Vortex e incubaron a 30°C por 1 hora. La reacción se detuvo incubando las muestras a 95 °C por 10 min. Todos los ensayos se realizaron empleando un control negativo (extracto enzimático hervido por 10 min). Después las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min y se separaron los sobrenadantes. El producto formado fue cuantificado de acuerdo a Linster *et al.* (2007), que consistió en inyectar 200 μ l del sobrenadante (controles negativos y muestras) en un equipo de Cromatografía Líquida de alta performance HPLC (Elite La Chrome, modelo HP 1100), empleando una columna cromatográfica de intercambio iónico LichroCART®250-4,6 NH₂ (5 μ m) atemperada a 40°C. La cual se utilizó como fase móvil fosfato de amonio pH 3,7; con una gradiente de 10 a 500 mM, a un flujo

de 2 ml/min. El producto de la reacción se detectó a 254 nm utilizando como referencia 450 nm. El tiempo de elución del sustrato (GDP-Manosa) fue $13,47 \pm 0,3$ min y del producto Guaninadifosfato (GDP) $21,07 \pm 0,1$ min.

3.4.4.3 Actividad enzimática de GDP-L-galactosa fosforilasa (GGF)

La reacción se realizó de acuerdo a Linster *et al.* (2007). Para ello se mezcló 90 μ l del Tampón de reacción GGF (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Sulfato de potasio 1 mM, Cloruro de magnesio 2 mM, Cloruro de sodio 10 mM, Ditolitritol 1 mM, GDP-D-Glucosa 100 μ M) con 10 μ l del extracto enzimático y agua para un volumen total de 500 μ l de reacción. La mezcla se homogenizó en un vortex e incubó a 30°C por 1 hora. La reacción se detuvo incubando las muestras a 95°C por 10 min. Todos los ensayos se realizaron empleando un control negativo (extracto enzimático hervido por 10 min). Después las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min y se retiraron los sobrenadantes. El sobrenadante (controles negativos y extracto de los tejidos) fue cuantificado inyectando 200 μ l en un equipo de HPLC (Elite La Chrome, modelo HP 1100) empleando una columna cromatográfica de intercambio iónico LichroCART®250-4,6 NH₂ (5 μ m) atemperada a 40°C. Asimismo se utilizó como fase móvil fosfato de amonio pH 3,7, con una

gradiente de 10 a 500 mM, a un flujo de 2 ml/min. El producto de la reacción se detectó a una longitud de onda de 254 nm utilizando como referencia 450 nm. El tiempo de elución del sustrato (GDP-Manosa) fue $13,47 \pm 0,3$ min y del producto Guaninadifosfato (GDP) $21,07 \pm 0,1$ min.

3.4.4.4 Actividad enzimática de GDP-L-galactosa-1-fosfato fosfatasa (GFF)

El ensayo enzimático se realizó en base a Torabinejad *et al.* (2009). El cual consistió en 90 μ l del Tampón de reacción de GFF (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Cloruro de magnesio 3 mM, L-Fucosa-1-fosfato 500 μ M), 20 μ l del extracto enzimático y agua para un volumen total de 200 μ l de reacción. La mezcla se homogenizó en un vortex e incubó a 30°C por 1 hora. La reacción se detuvo incubando las muestras a 95°C por 10 min. Todos los ensayos se realizaron empleando un control negativo (extracto enzimático hervido por 10 min). Luego se procedió a determinar el fosfato inorgánico en los controles negativos y muestras evaluadas de acuerdo a González *et al.* (1992).

3.4.4.5 Actividad enzimática de L-galactosa deshidrogenasa (GDH)

La actividad de la enzima se determinó mediante el protocolo propuesto por Laing *et al.* (2004) y Gatzek *et al.* (2002) que consistió en mezclar 300 μ l de los componentes del Tampón GDH (Tris-HCl 100 mM pH 8,0 NAD 1 mM; L-Galactosa 1 mM), 100 μ l del extracto enzimático y agua para un volumen total de 1 ml de reacción. Para esta reacción se midió la concentración a través de un espectrofotómetro de luz UV/Luz visible con cubetas de plástico a una longitud de onda de 340 nm con una cinética enzimática cada 5 seg por 8 min a temperatura ambiente. Todos los ensayos se realizarán empleando un control negativo con extracto enzimático inactivo (extracto enzimático hervido por 10 min).

IV. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Los datos experimentales de la cuantificación de proteínas totales y medición de las actividades catalíticas de las enzimas de la vía Smirnof-Wheeler fueron almacenados en una base de datos del programa Microsoft Excel 2010. Los análisis estadísticos (promedios, error estándar de la media, ANOVA) se hicieron con el programa PASW v 19.

IV. RESULTADOS

El extracto enzimático obtenido de los tejidos de *M. dubia* mostró diferencias en su concentración de proteínas totales (Figura 1). La concentración más alta de proteínas totales se encontró en los extractos enzimáticos de las hojas ($0,360 \pm 0,023$ mg/ml), siendo dos veces mayor que de la cáscara ($0,175 \pm 0,028$ mg/ml) y aproximadamente 11 veces mayor que de la pulpa de los frutos ($0,033 \pm 0,001$). Estas diferencias fueron significativas ($F = 41$, $gl = 2$, $P = 0,007$).

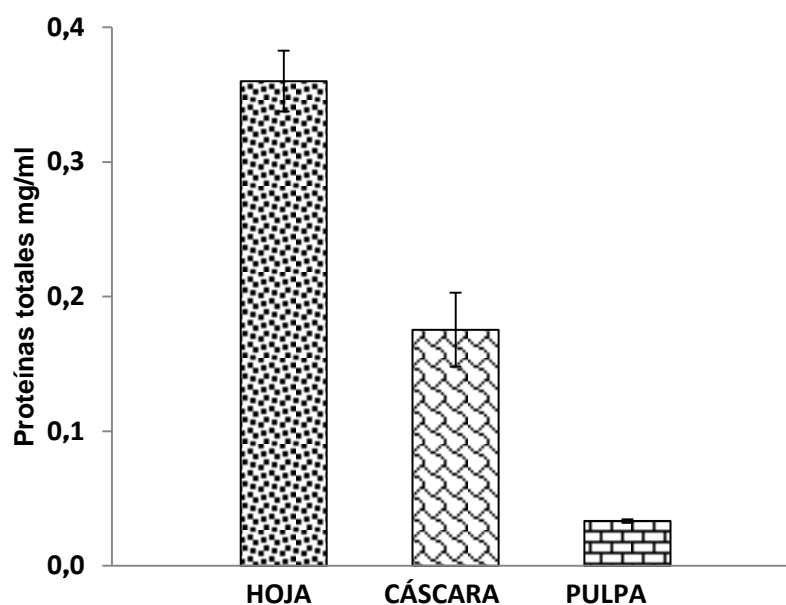


Figura 1. Concentración de proteínas totales en hoja, cáscara y pulpa de los frutos de *M. dubia*.

La actividad enzimática específica de la GDP-D-manosa pirofosforilasa fue variable en los tres tejidos analizados de *M. dubia* (Figura 2). La mayor actividad se registró en la pulpa (138 ± 9 nmol Manosa-1-fosfato. min^{-1} . μg de

proteína⁻¹), siendo hasta 2,5 veces más alta con respecto a la cáscara (55 ± 7 nmol Manosa-1-fosfato. min⁻¹. μg de proteína⁻¹) y aproximadamente 5 veces mayor que en la hoja (29 ± 1 nmol Manosa-1-fosfato. min⁻¹. μg de proteína⁻¹). Las diferencias en la actividad catalítica de esta enzima, entre los tres tejidos analizados, fueron estadísticamente significativas ($F = 149$, $gl = 2$, $P = 0,001$), particularmente al comparar la actividad entre pulpa con cáscara y pulpa con hoja.

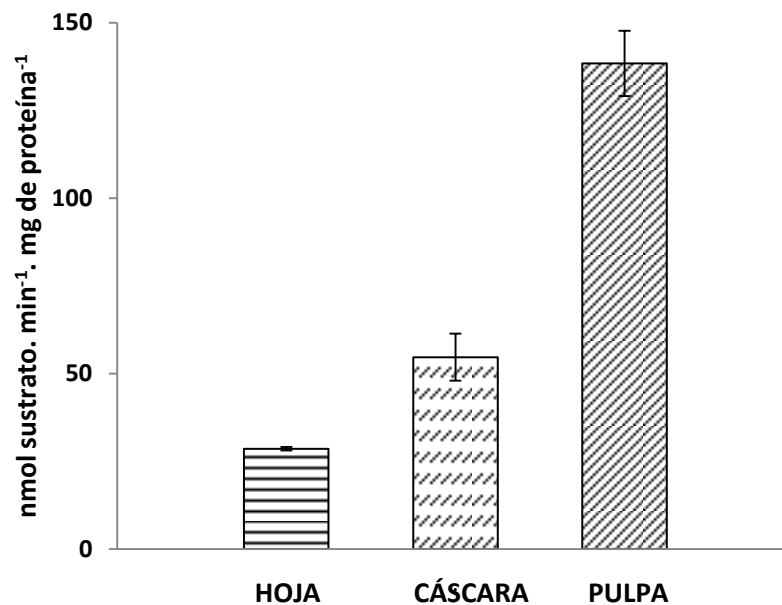


Figura 2. Actividad enzimática específica de GDP-D-manosa pirofosforilasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de *M. dubia*.

La actividad enzimática específica de la GDP-D-manosa epimerasa también mostró diferencias en los tres tejidos analizados de *M. dubia* (Figura 3). Registrándose la actividad enzimática más alta en la pulpa (198 ± 74 nmol D-Manosa. min⁻¹. μg proteína⁻¹), siendo aproximadamente cuatro veces más alta

con respecto a la cáscara (52 ± 2 nmol D-Manosa. min^{-1} . μg de proteína $^{-1}$) y siete veces mayor que en las hojas (28 ± 15 nmol D-Manosa. min^{-1} . μg de proteína $^{-1}$). Estas diferencias en la actividad catalítica de esta enzima, entre los tres tejidos analizados, fueron estadísticamente significativas ($F = 9$, $gl = 2$, $P = 0,05$), aunque son notables las diferencias al comparar la actividad encontrada en la pulpa con respecto a los demás tejidos analizados.

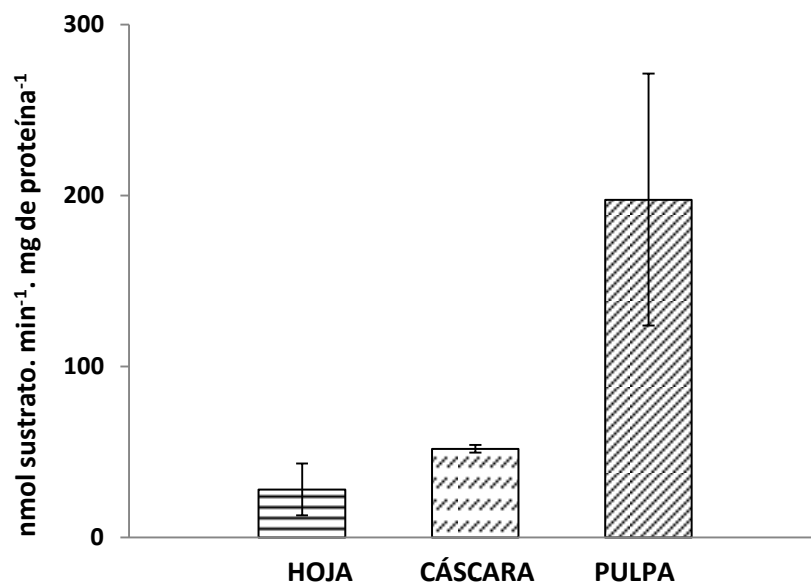


Figura 3. Actividad enzimática específica de GDP-D-Manosa epimerasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de *M. dubia*.

La enzima GDP-L-Galactosa fosforilasa también mostró ligeras diferencias en su actividad enzimática específica entre los tejidos analizados (Figura 4). Como se observó con las anteriores enzimas analizadas, se registra una mayor actividad en la pulpa ($4,7 \pm 0,3$ nmol L-Glucosa. min^{-1} . μg de proteína $^{-1}$) siendo hasta 1,6 veces mayor que en las hojas ($2,9 \pm 0,7$ nmol de L-Galactosa. min^{-1}).

μg de proteína⁻¹) y la cáscara ($2,9 \pm 0,2$ nmol de L-Galactosa. min⁻¹. μg de proteína⁻¹), estas diferencias estadísticamente fueron significativas ($F = 10$, $gl = 2$, $P = 0,05$).

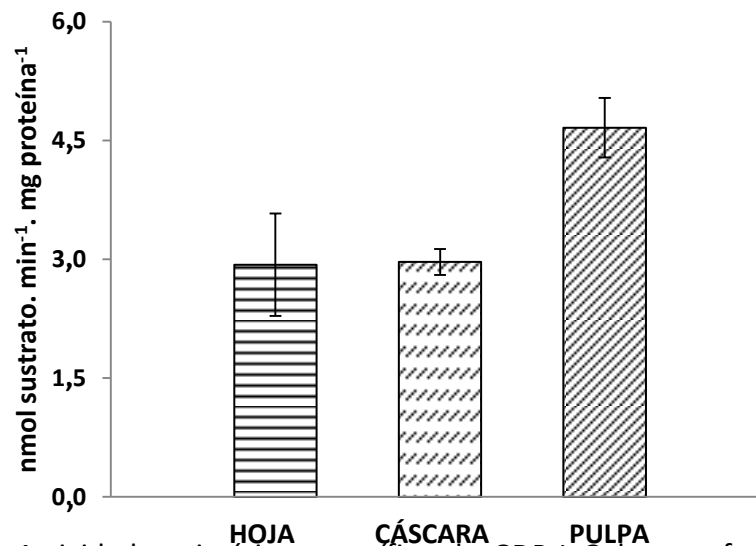


Figura 4. Actividad enzimática específica de GDP-L-Galactosa fosforilasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de *M. dubia*.

En el caso de la enzima L-Galactosa-1-fosfato fosfatasa se registra marcadas diferencias en su actividad entre los tejidos analizados (Figura 5). Igualmente, se observa una predominancia de la actividad de esta enzima en la pulpa de los frutos (460 ± 50 nmol de L-Fucosa. min⁻¹. μg proteína⁻¹) presentando aproximadamente cinco veces más actividad con respecto a la cáscara (100 ± 7 nmol de L-Fucosa. min⁻¹. μg proteína⁻¹) y hasta nueve veces más que en las hojas (51 ± 6 nmol de L-Fucosa. min⁻¹. μg proteína⁻¹). Las diferencias en la actividad catalítica de la enzima mencionada entre los tejidos analizados fueron altamente significativas ($F = 118$, $gl = 2$, $P = 0,001$), particularmente al

comparar la actividad entre pulpa con cáscara y pulpa con hoja. Aunque la actividad de esta enzima fue mayor en la cáscara con respecto a las hojas.

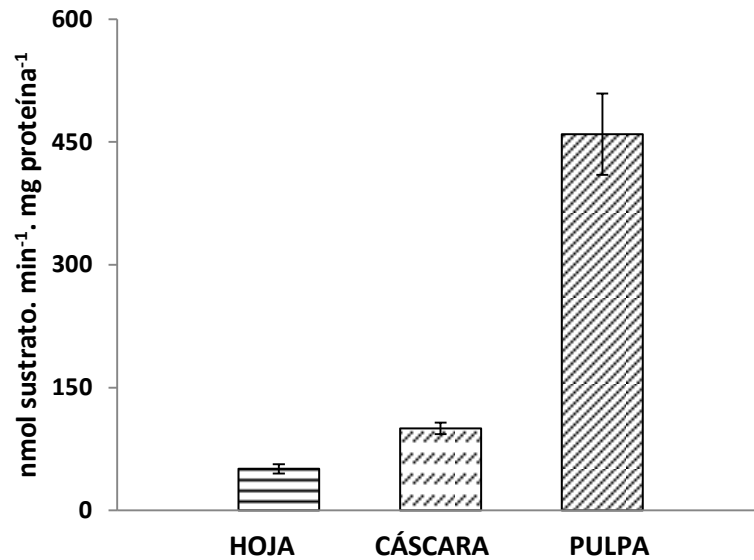


Figura 5. Actividad enzimática específica de L-Galactosa 1-P-fosfatasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de *M. dubia*.

Finalmente, la actividad enzimática específica de la L-Galactosa Deshidrogenasa fue similar en los tres tipos de tejidos analizados de *M. dubia* (Figura 6). Aunque, se observó que la actividad catalítica específica fue mayor en la pulpa (227 ± 232 nmol de L-Galactosa · min⁻¹ · µg de proteína⁻¹), seguido por las hojas (206 ± 105 nmol de L-Galactosa · min⁻¹ · µg de proteína⁻¹) y la cáscara (51 ± 41 nmol de L-Galactosa · min⁻¹ · µg de proteína⁻¹). Estas diferencias no fueron significativas ($F = 0,83$, $gl = 2$, $P = 0,52$).

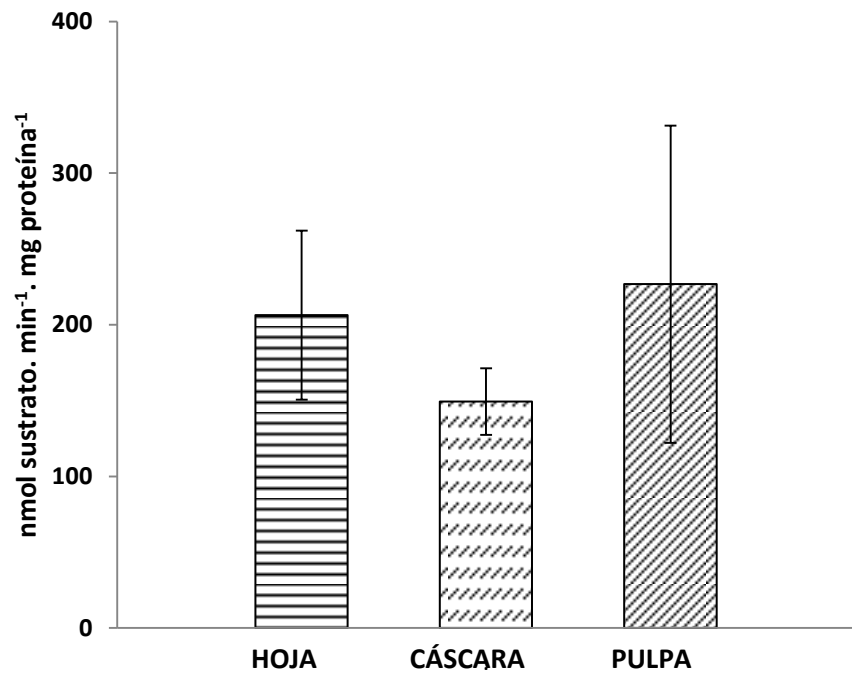


Figura 6. Actividad enzimática específica de L-Galactosa deshidrogenasa en hoja, cáscara y pulpa de frutos de *M. dubia*.

V. DISCUSIÓN

En base a los protocolos de Gatzek *et al.* (2002), Hancock *et al.* (2003) y Conklin *et al.* (2006) modificado, se ha extraído las proteínas totales de hojas, cáscara y pulpa de frutos de *M. dubia*. Se registra una mayor concentración en hojas, seguido por la cáscara y la concentración más baja fue en la pulpa (Figura 1). Estas diferencias pueden atribuirse a varios factores. Primero, las hojas y cáscara son tejidos poco hidratados, en comparación con la pulpa, debido a que presenta un alto contenido de agua, que puede superar el 94% (FAO, 2006). En consecuencia, como las proteínas se extrajeron de la misma cantidad de muestra, se espera que la pulpa presente menor contenido protéico. Segundo, las hojas y la cáscara presentan mayor densidad de células de tamaño relativamente pequeño, con alto contenido de proteínas porque realizan diversos procesos metabólicos, desde la fotosíntesis, respiración celular y biosíntesis de diversos compuestos como otras vitaminas (Tedone *et al.* 2004). Por lo contrario, las células de la pulpa tienen la función primaria de almacenar agua y diversos metabolitos sintetizados en otros tejidos, pero también pueden ocurrir diversos procesos metabólicos como la biosíntesis de antocianinas y vitaminas. Por tanto, presentan una menor concentración de proteínas. El tercer factor puede estar relacionado a la distribución diferencial (por tipo de tejido) de las proteínas de acuerdo a su tamaño. Pues en el proceso de extracción de proteínas para la diálisis se empleó una membrana que puede retener proteínas ≥ 6000 Da, observándose que después de la

diálisis en las hojas se perdió 18% de proteínas, en pulpa el 48% y en cáscara el 58% (ver anexo 9). Consecuentemente, en la pulpa y la cáscara abundan las proteínas solubles con pesos moleculares menores de 6000 Da, y eso explica en parte la menor concentración de proteínas en estos tejidos después de la diálisis, debido a la pérdida de estas proteínas de bajo peso molecular en este proceso.

Esto nos indica que los tres tejidos tienen la capacidad biosintética de vitamina C, por tanto, la acumulación de vitamina C en la pulpa de los frutos se podría atribuir principalmente a la biosíntesis *in situ* y parcialmente a la importación por transporte a partir de las hojas y cáscara de los frutos. Los resultados muestran que las hojas, cáscara y la pulpa de *M. dubia* presentan las cinco enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler (Figuras 2- 6). Diversas investigaciones en otras especies de plantas como *Arabidopsis thaliana* y *Actinidia chinensis* también detectaron la actividad de las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler, confirmando que esta vía es la más importante para la biosíntesis de vitamina C en las plantas (Wheeler *et al.* 1998, Smirnoff *et al.* 2001). Así, Hancock *et al.* (2003) midió la actividad de las enzimas en tejidos vasculares y en el floema de *Cucurbita* spp. Varios estudios también detectaron las enzimas de la vía metabólica mencionada en hojas de *Arabidopsis thaliana* (Wolucka *et al.* 2001, Gatzek *et al.* 2002, Laing *et al.*

2004, Dowdle *et al.* 2007, Leferink *et al.* 2007) y en hojas de *Actinidia chinensis* (Laing *et al.* 2007) y *Actinidia deliciosa* (Torabinejad *et al.* 2009).

Las evidencias experimentales muestran que existen diferencias en la actividad de algunas de las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler entre los tejidos analizados de *M. dubia* (Figuras 1). Estas diferencias no se pueden atribuir a pérdida diferencial de las enzimas durante la diálisis, porque estudios realizados en otras especies como *Arabidopsis thaliana* y *Actinidia chinensis*, muestran que los homólogos de estas enzimas tienen pesos moleculares, dependiendo de la enzima, que oscilan entre 34 y 362 KDa (Hourichi *et al.* 1988, Wolucka *et al.* 2001, Gatzek *et al.* 2002, Laing *et al.* 2004, Mieda *et al.* 2004, Major *et al.* 2005). Por tanto, parte de estas diferencias pueden deberse a la expresión diferencial de los genes que codifican estas enzimas, tal como lo demuestra Castro *et al.* (2011), quienes reportan mayores niveles de expresión de los genes codantes de estas enzimas en la pulpa y cáscara con respecto a las hojas. Esos resultados sugieren que al existir mayores niveles de ARNm codantes de las enzimas mencionadas se puede incrementar la síntesis de las proteínas respectivas, consecuentemente en ciertos tejidos como la pulpa (Figuras 2, 3 y 5) habrán más moléculas enzimáticas de la vía en mención. Además, estudios realizados en otras especies de plantas también muestran expresión diferencial de los genes que codifican las enzimas de esta vía metabólica.

Un aspecto adicional a considerar es el alto contenido de vitamina C encontrado en los tejidos de *M. dubia* en contraste a otras especies y que se podría atribuir a la mayor actividad de las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler. Esto se evidencia al comparar la actividad de las enzimas de esta vía metabólica en *M. dubia* con respecto a otras especies de plantas (ver anexo 10). Por ejemplo, en hojas la mayoría de enzimas evaluadas, a excepción de la GDP-L-galactosa fosforilasa, presentan entre 4 a más de 1200 veces mayor actividad que en otras especies de plantas que producen bajo contenido de vitamina C, tales como *Arabidopsis thaliana* y *Actinidia spp.* (Gatzek *et al.* 2002, Laing *et al.* 2004, 2007, Dowdle *et al.* 2007, Torabinejad *et al.* 2009). Asimismo, al comparar la actividad de la enzima L-Galactosa-1-fosfato fosfatasa a nivel de frutos (promedio pulpa y cáscara) de *M. dubia* con frutos de *Actinidia deliciosa* se encuentra que en *M. dubia* la actividad es más de 450 veces mayor, lo cual ayudaría explicar el alto contenido de vitamina C en los frutos del camu camu.

VI. CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar un método de extracción de cinco enzimas de la vía Smirnof-Wheeler, apropiado para medir su actividad catalítica, a partir de hojas, cáscara y pulpa de frutos de *M. dubia*.
- La concentración de proteínas totales en los extractos enzimáticos muestra diferencias significativas entre los tejidos evaluados, siendo mayor en las hojas ($0,360 \pm 0,023$ mg/ml) con respecto a la cáscara ($0,175 \pm 0,028$ mg/ml) y la pulpa ($0,033 \pm 0,001$ mg/ml).
- Los resultados nos indican que los tres tejidos analizados tienen capacidad de realizar la biosíntesis de vitamina C, asimismo las hojas, cáscara y pulpa de *M. dubia* presentan las enzimas de la vía Smirnof-Wheeler.
- Existen diferencias en la actividad de varias de las enzimas de Smirnof-Wheeler al comparar entre los tejidos analizados de *M. dubia*, siendo predominantemente mayor la actividad de las enzimas GDP-D-manosa pirofosforilasa, GDP-D-Manosa epimerasa, GDP-L-Galactosa fosforilasa y L-Galactosa-1-fosfato fosfatasa en la pulpa con respecto a la cáscara y las hojas.

VIII. RECOMENDACIONES

- Identificar las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler en otros tejidos de *M. dubia*, tales como la flor, raíz, semilla y frutos en diferentes estados de maduración.
- Determinar si otras vías metabólicas contribuyen en la biosíntesis de vitamina C en los diferentes tejidos de *M. dubia* para la síntesis de vitamina C. Asimismo, el rol de las reacciones enzimáticas de reciclaje de vitamina C.
- Purificar y caracterizar las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler y otras vías relacionadas, para comprender sus mecanismos catalíticos y de regulación a fin de establecer estrategias de ingeniería metabólica y mejora genética de la especie.
- Comparar la actividad de las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler y vías metabólicas relacionadas entre diferentes especies vegetales de la amazonía peruana a fin de constatar la relación con el contenido de vitamina C.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
2. Castro, J., Cobos, M., Ramírez R., Egoávil, A., Gutierrez, F., Torres, F., Imán, S., Rojas, R., Siguas, M., Córdova, A., Adrianzén, P., Marapara, J. (2011). Influencia de Expresión genética y actividad catalítica de enzimas de la vía de Smirnoff-Wheeler en la variación de la producción de vitamina C en *Myrciaria dubia* (HBK) Mac Vaugh "camu camu". Encuentro científico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima – Perú. 2011.
3. Chotani G., Dodge T., Hsu A., Kumar M., Laduca R., Trimbur D., Weyler W., and Sanford K. (2000). The commercial production of chemicals using pathway engineering *Biochem. Biophys.* 1543: 434-455.
4. Conklin P. L., Gatzek S., Wheeler G., Dowdle J., Raymond M., Rolinski S., Isupov M., Littlechild J. A. and Smirnoff N. (2006). *Arabidopsis thaliana* VTC4 encodes L-Galactose-1-P Phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *The Journal Biological Chemistry.* 281 (23): 15662-15670.

5. Conklin P. L., Saracco S. A., Norris S. R. and Robert L. (1999). Last Identification of Ascorbic Acid-Deficient *Arabidopsis thaliana* Mutants Copyright. By the Genetics Society of America. 154: 847–856.
6. Davis J. A., Perugini M., Smith B. J., Stewart J. D., Ilg T., Hodder A. N. and Handman E. (2004). E. Properties of GDP-mannose Pyrophosphorylase, a Critical enzyme and Drug Target in *Leishmania mexicana*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 279, N° 13, Issue of March. 26: 12462-12468.
7. Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S. and Smirnoff N. (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-Galactose Phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. The Plant Journal. 52: 673-689.
8. FAO (2006). “CAMU CAMU” *Myrciaria dubia*. http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfr_escos/camucamu.HTM. Accesado. 23 Agosto 2012.
9. Gatzek S., Wheeler G. L. and Smirnoff N. (2002). Antisense suppression of L-Galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-Galactose synthesis. The Plant Journal. 30: 541-553.

10. Gentry A. (1993). A Field guide to the Families and Genera and Woody Plants of Norwets South America with supplementary notes on Herbaceous taxa. Department of Conservation, Biology- Conservation International. Washington, D.C., USA. 15: 95.
11. González R., Sánchez N. and Ruiz G. M. (1992). Un método colorimétrico modificado para la determinación de ortofosfato en presencia de altas concentraciones de ATP Anal Biochem. 2: 235-238.
12. Hancock R. D. y Viola R. (2005), Biosynthesis and catabolism of L-ascorbic acid in plants. Critical Reviews in Plant Sciences. 24: 167-18.
13. Hancock R. D., Mcrae D., Haupt S. and Viola R. (2003). Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. Research article BMC Plant Biology. 1-13.
14. Hourichi T., Suzuki, Hiruma M. y Saito N. Purification and characterization of L-Fucose (L-Galactose) dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. (1990). Biolchem. 53 (6): 1493-1501.
15. Imai T., Karita S., Shiratori G., Hattori M., Nunome T., Ôba K. and Masashi H. (1999). L-Galactono-alfa-lactone dehydrogenase from Sweet Potato: Purification and cDNA. Sequence Analysis Plant Cell Physiol. 39 (12): 1350-1358.

16. Imai T., Ban Y., Terakami S., Yamamoto T. and Moriguchi T. (2008). L-Ascorbate biosynthesis in peach: cloning of six L-Galactose pathway-related genes and their expression during peach fruit development *Physiologia Plantarum*. 136: 139-149.
17. Iman S. (2000). Cultivo de camu camu *Myrciaria dubia* H.B.K. en la Región Loreto. Manual N° 01-00. PRONARGEB. INIA. Iquitos - Perú. 32. pag.
18. Ishikawa Takahiro and Shigeoka Shigeru. (2008). Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci. Biochem.* 72: 1143-1154.
19. Kalliola R. (1993). Vegetación Húmeda Tropical en el Llano Subandino. Proyecto Amazonía, Universidad de Turko, Finlandia. :265.
20. Laing A. W., Wright A. M, Cooney J. and Bulley M. S. (2007). The missing step of the L-Galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-Galactose guaniltransferase, increases leaf ascorbate content. *Plant Biology*. 29. 104 (22): 9534-9539.
21. Laing W. A., Bulley S., Wright M., Cooney J., Jensen D., Di Barraclough and Macrae E. (2004). A highly specific L-galactose-1-phosphate

phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis. *Plant Biology*. 30, 101 (48): 16976-16981.

22. Laing W. A., Frearson N., Bulley S. and Macrae E. (2004). Kiwifruit L-Galactose dehydrogenase: Molecular, Biochemical and Physiological aspects of the enzyme. *Functional Plant Biology*. 31: 1015-1025.
23. Leferink N., Van den Berg W. and Van Berkel W. (2007). L-Galactono lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS Jourosi. The Autilas Journals Compilation*. : 713-726.
24. Linster C., Gomez, T., Christensen K., Adler L. Young B., Brenner C. and Clarke S. (2007). *Arabidopsis* VTC2 Encodes a GDP-L-Galactose phosphorylase, the Last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in Plants. *Biol. Chem. Journal*. 282: 14.
25. Linster C., Adler L., Webb K., Christensen K., Brenner C. and Clarke S. (2008). A Second GDP-L-Galactose phosphorylase in *Arabidopsis* en route to vitamin C. *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (27): 18483–18492.

26. Major L. M., Wolucka B. A. and Naismith J. H. (2005). Structure and function of GDP-Mannose- 3,5- Epimerase: An enzyme which three chemical reactions at the same active site. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 18309-18320.
27. Mieda T., Yabuta Y., Rapolu M., Motoki T., Takeda T., Yoshimura K., Ishikawa T. and Shigeoka S. (2004). Feedback Inhibition of spinach L-Galactose dehydrogenase by L-Ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 45, (9): 1271–1279.
28. Pinedo M., Inga H., Pinedo S. y Linares C. (2002). Variación del contenido de ácido ascórbico de camu camu silvestre en Loreto, Perú. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Programa de Ecosistemas Terrestres. Informe de colección de germoplasma. 7 pag.
29. Roselló S. (2007). Mejora de la calidad del tomate para fresco. Área de producción vegetal. Dep. Ciencias Experimentales. Jaume I, Campus de Riu Sec, Castelló de la Plana. :12071
30. Smirnoff N., Conklin P. and Loewus F. (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Physiol Plant Mol. Biol. Journal.* 52: 437-467.

31. Smirnoff Nicholas (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond B. 355: 1455-1464.
32. Smirnoff Nicholas and Wheeler Glen L. (2000). Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 35 (4):291-314.
33. Tedone L., Hancock R. D., Alberino S., Haupt S. and Viola R. Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. BMC Plant Biol.17; 4:16.
34. Torabinejad J., Donahue J. L., Gunesequera B. N., Allen-Daniels M. J. and Gillaspay G. E. (2009). VTC4 Is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. Plants Physiology. 150: 951-961.
35. Valpuesta V. y Botella M. (2004). Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. Trends Plant Sci. 9 (1):573-577.
36. Wheeler G., Jones M., Y Smirnoff, N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature. 393:365-369.

37. Wolucka B. A., Persiau G., Doorsseleare J. V., Davey M., Demol H., Vandekerckhove J., Montagu M., Zabeau M. and Boerjan W. (2001). Partial purification and identification of GDP-mannose 3, 5 epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin c pathway. *Biochemistry*. 98 (26):14843-14848.

X. ANEXOS

ANEXO 1



Foto 1.

Laboratorio de biotecnología del centro de investigaciones de recursos naturales CIRNA-UNAP.

ANEXO 2



03° 57' 17" LS y 73° 24' 55" LO

Foto 2. Ubicación geográfica del área de muestreo.

ANEXO 3

Lista de materiales utilizados para la realización de la tesis.

Equipos

- Autoclave (Yamoto)
- Baño María (Labnet)
- Balanza Analítica (Sartorius CP2245)
- Destilador de Agua (Thermo Scientific)
- Equipo de Ultrasonido (Branson)
- Espectrofotómetro (Genesys 6.0).
- Cámara Digital (Panasonic Lumix 10.0X)
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen)
- Cocina eléctrica (Oxford)
- Congeladora (Friolux)
- Computadora (COMPAQ)
- Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC – HITACHI)
- Horno Microondas (LG)
- Impresora (CANON)
- Purificador de Agua (Thermo Scientific)
- PH metro (Thermo Scientific)

- Shearaker (Thermo Scientific)
- Vortex. (Genie 2).

Materiales de Vidrio

- Frascos tapa rosca de 50, 100 y 1000 ml.
- Fiolas de 500 y 2000 ml
- Morteros y pilones.
- Probetas Graduadas de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Vasos de precipitado de 50, 250 y 500 ml.

Materiales de Plástico

- Membrana de diálisis (Fisherbrand MWCO 6000-8000).
- Miracloft (Muselina)
- Micropipetas de 0.1- 2.0; 0.5-10; 2.0-20; 20-200; 100-1000 μ l.
- Microtubos de 1,5 y 2 ml.
- Parafina
- Pastilla magnética
- Piceta de 500 ml.
- Separador de microtubos (Raps)
- Tips 1-10 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l
- Tubos Falcón de 15 y 50 ml.

Materiales personales

- Bisturí
- Bolsas plásticas
- Calculadora científica
- Cuaderno de apuntes
- Detergente
- Etiquetas
- Gorro
- Guantes
- Hojas A-4
- Hipoclorito de Sodio 0.5%
- Lapiceros
- Mandil
- Marcadores
- Mascarillas
- Papel secante
- Papel Aluminio
- Perforador

Tampones

- Tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH: 7,5, MgCl₂ 1 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, Ácido aminocaproico 1 mM, benzamedina hidrocloreuro 1 mM, PMSF 1 mM, PVP 3,0% y glicerol 20%).
- Tampón de diálisis, (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y 1 mM DTT).
- Tampón de GDP-Manosa pirofosforilasa (GMP), (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 8 mM, GTP 100 μM, Manosa-1-fosfato 100 μM, DTT 1 mM, pirofosfatasa inorgánica 0,01 U/μl).
- Tampón de GDP- Manosa epimerasa reacción de (GME), (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, GDP-D-Manosa 100 μM).
- Tampón de GDP-L-galactosa fosforilasa (GGF), (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, KH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 10 mM, DTT 1 mM, GDP-D-Glucosa 100 μmol).
- Tampón de GDP-L-galactosa 1-fosfato fosfatasa (GFF), (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, L-Fucosa-1-fosfato 500 μmol).

- Tampón de L-Galactosa deshidrogenasa de (GDH), (Tris HCl 100 mM pH 8, NAD 1 mM; L-Galactosa 1 mM).

Reactivos

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Azul de Comassie G-250
- Ácido Orto Fosfórico (85%)
- Ácido aminocaproico
- Ácido clorhídrico
- Alcohol medicinal
- Benzamedina hidrocloreuro monohidratado
- Bicarbonato de sodio
- Cianuro de potasio
- Citocromo C
- Cloruro de Magnesio $MgCl_2$
- Cloruro de sodio ($NaCl_2$)
- Ditioneitol (DTT)
- Etanol
- Fosfato de potasio monobásico
- Fluoruro fenilmetilsulfonil (PMSF)
- Glicerol 20% y 87%

- GDP-D-glucosa
- GDP Manosa
- Guanosintrifosfato (GTP)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- L-fucosa
- L-galactosa
- L-gulono 1,4 lactono
- Manosa 1- fosfato
- Molibdato de sodio
- Nicotinamidadinucleotido (NAD).
- Oxalato de verde de malaquita
- Polivinilpirrolidona (PVP)
- Albumina de Suero Bovino (BSA)
- Tris-HCl
- Triton X-100.

ANEXO 4

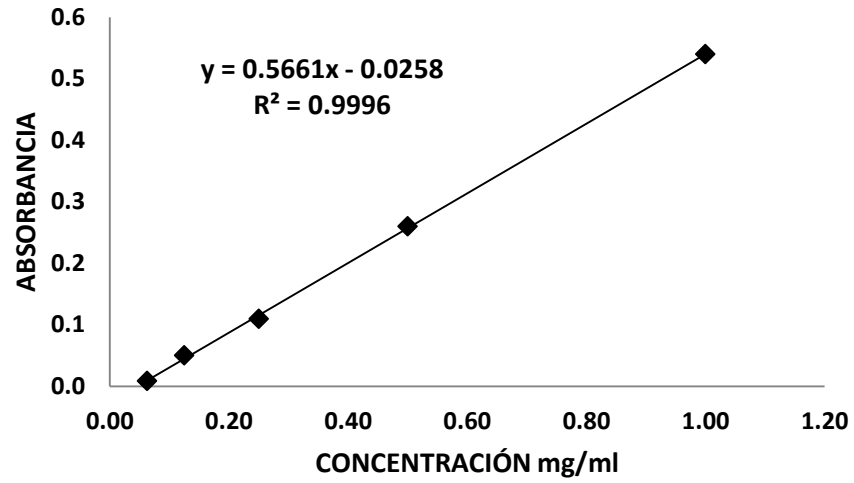


Gráfico 1. Curva estándar de confiabilidad para la concentración de proteínas totales por el método de Bradford a 596 nm.

ANEXO 5

Tabla 1. Datos de espectrofotometría de la concentración de proteínas totales en los diferentes tejidos de *M. dubia*.

MUESTRAS	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	PROMEDIO mg/ml	DESVIACIÓN ESTANDAR
HOJA	0,194	0,388	0,360	0,023
	0,162	0,332		
CÁSCARA	0,054	0,141	0,175	0,028
	0,093	0,210		
PULPA	0,008	0,031	0,033	0,001
	0,006	0,035		

ANEXO 6

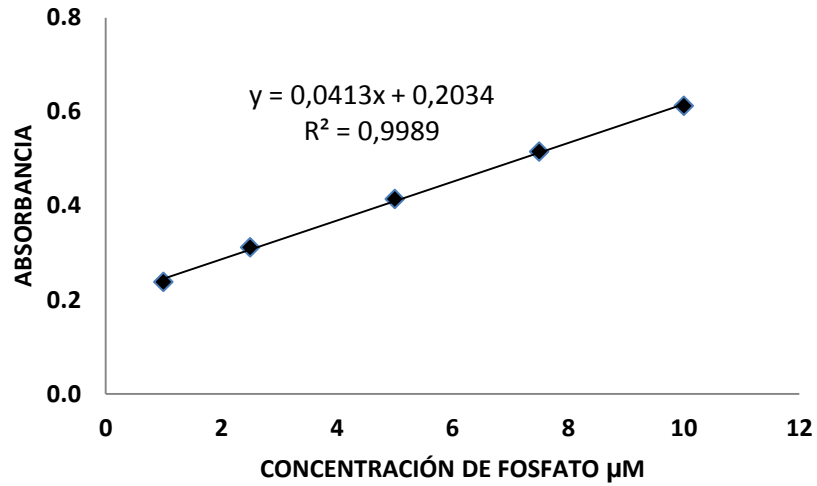


Gráfico 2. Ecuación de la curva estándar de confiabilidad para calcular la concentración de fosfato inorgánico liberado de 1-10 μM.

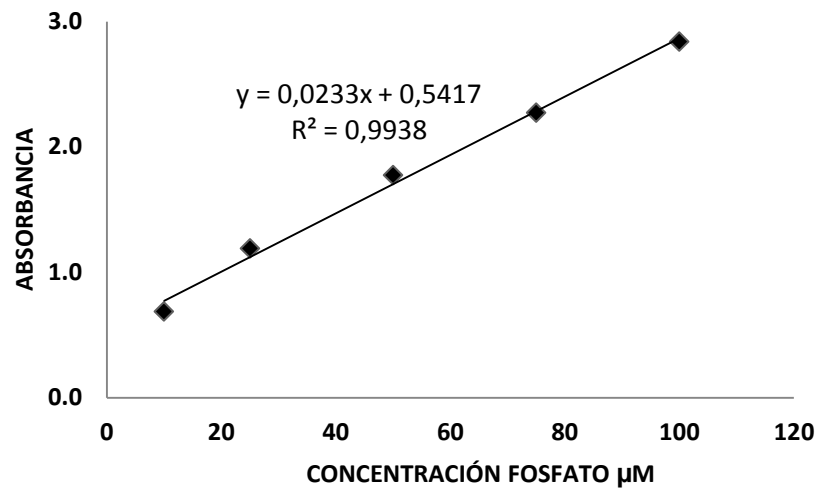


Gráfico 3. Ecuación de la curva estándar de confiabilidad para calcular la concentración de fosfato inorgánico liberado de 10-100 μM.

ANEXO 7

Tabla 2. Modificación de las condiciones para el protocolo realizado para el proceso de extracción de enzimas.

REACTIVOS	Protocolos de extracción según autores			Modificado
	Gatzek <i>et al.</i> (2002)	Hancock <i>et al.</i> (2003)	Conklin <i>et al.</i> (2006)	
Tris-HCl	50 mM (pH. 7,5)			100 mM (pH. 7,5)
HEPES		50 mM (pH. 8,0)	50 mM (pH. 7,5)	0
DTT	2 mM	5mM	2 mM	3 mM
EDTA	1 mM	1mM	0	1 mM
PVP	1%	0	2%	3%
Ácido aminocaproico	0	0	1 mM	1 mM
Benzamedina hidrocloreuro	0	1 mM	1 mM	1 mM
Fluoruro fenylmethylsulfonyl (PMSF)	0	0,5 mM	1 mM	1 mM
Glycerol	20%	0	0	20%
MgCl ₂	0	0	10 mM	1 mM
EGTA	0	1 mM	0	0
Ácido aminocaproico	0	0	1 mM	1 mM
Muselina	1 capa	0	0	2 capas
Centrifugar	20000 rpm/20 min	10000g/10 min	20000g/20 min	15000 rpm/20 min
12 horas de diálisis				Incluido

ANEXO 8

Enzimas evaluadas en el trabajo de tesis.

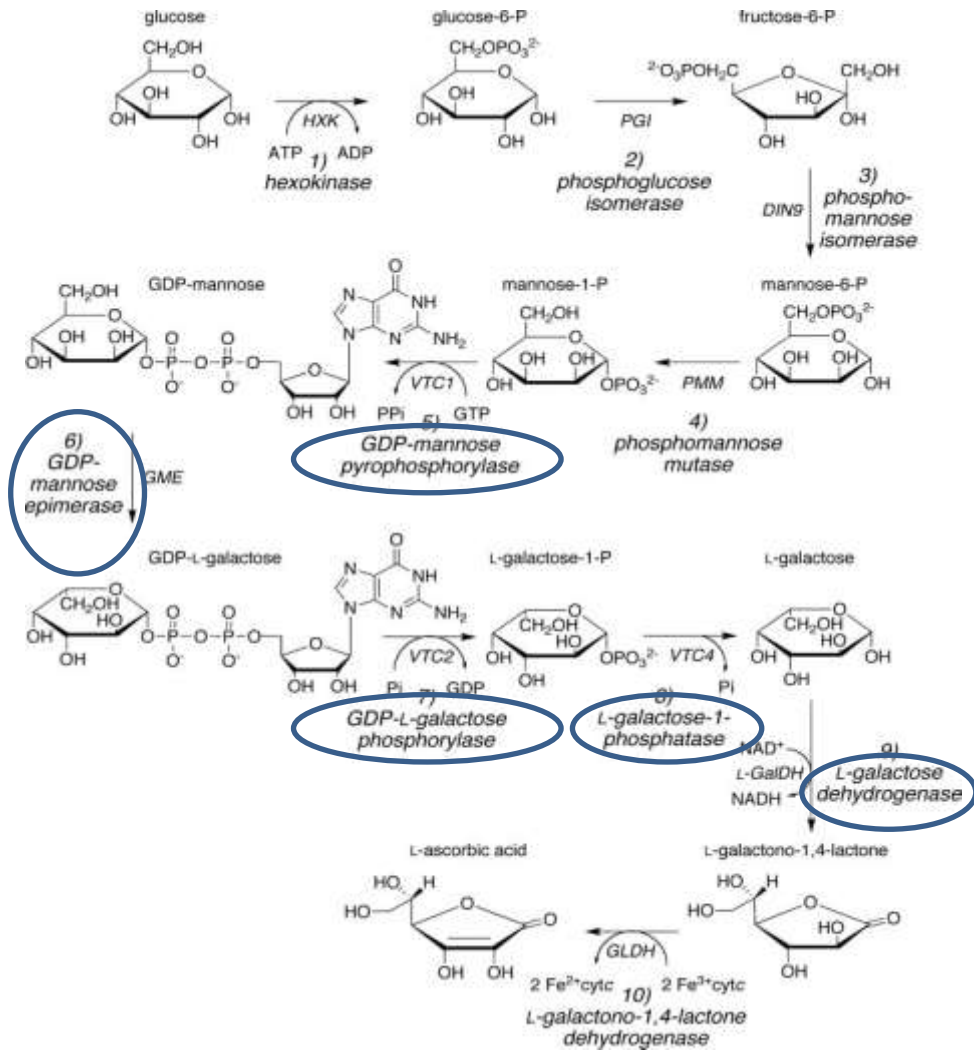


Gráfico 4. Vía metabólica de Smirnov-Wheeler en la síntesis de vitamina C (ácido ascórbico).

ANEXO 9

TABLA 3. Pérdida de proteínas de bajo peso molecular durante el proceso de diálisis por 12 horas.

Tejidos	Concentración Inicial mg/ml	Concentración final mg/ml	% de pérdida por diálisis
HOJA	0,439	0,360	18
PULPA	0,063	0,033	48
CÁSCARA	0,425	0,175	58

ANEXO 10

Tabla 4. Comparación de la actividad específicas con otros trabajos en otras especies.

ENZIMAS	nmol sust. min ⁻¹ . mg prot ⁻¹			Proporción de actividad de las enzimas de <i>M. dubia</i> respecto a otras especies	ESPECIES	AUTORES
	HOJA	CÁSCARA	PULPA			
GDP-D-manosa pirofosforilasa	28,6 ± 0,52	54,6 ± 6,71	138,4 ± 9,32		<i>Myrciaria dubia</i>	Resultados del trabajo
	6,6 ± 1,2			4,33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dowdle <i>et al.</i> (2007)
GDP-D-manosa epimerasa	28,1 ± 15,24	51,9 ± 2,27	197,7 ± 73,74		<i>Myrciaria dubia</i>	Resultados del trabajo
	0,11 ± 0,01			255,45	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dowdle <i>et al.</i> (2007)
	0,17 ± 0,01			165,29	<i>Actinidia chinensis</i> (Kiwi)	Laing <i>et al.</i> (2007)
GDP-L-galactosa fosforilasa	2,93 ± 0,65	2,97 ± 0,6	4,66±0,38		<i>Myrciaria dubia</i>	Resultados del trabajo
	12,4 ± 1,7			0,23	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dowdle <i>et al.</i> (2007)
L-galactosa 1-P-fosfatasa	50,7 ± 5,6	100 ± 7,06	49,7±49,63		<i>Myrciaria dubia</i>	Resultados del trabajo
	4,0			9,05	<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwi)	Torabinejad <i>et al.</i> (2009)
	5,4			9,38	<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwi)	
	140 ± 10			0,36	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dowdle <i>et al.</i> (2007)

	0,163			311,04	<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwi)	Laing <i>et al.</i> (2004)
		0,22 (fruto)		454,54	<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwi)	
L-galactosa deshidrogenasa	206,24 ± 99,0	149,37 ± 49,0	226,72 ± 114,0		<i>Myrciaria dubia</i>	Resultados del trabajo
	8,0 ± 1,0			25,8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Dowdle <i>et al.</i> (2007)
	0,170 ± 0,019			1213,17	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gatzek <i>et al.</i> (2002)
	0,165 ± 0,014			1249,93		

ANEXO 11

Tabla 5. Análisis de variancia-ANOVA de las proteínas totales de los tejidos de *M. dubia*.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,108	2	,054	40,762	,007
Within Groups	,004	3	,001		
Total	,111	5			

Tabla 6. Análisis estadístico de las proteínas totales aplicando la prueba de Tukey HSD.

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	,18450*	,03632	,030	,0327	,3363
	3,00	,32700*	,03632	,006	,1752	,4788
2,00	1,00	-,18450*	,03632	,030	-,3363	-,0327
	3,00	,14250	,03632	,059	-,0093	,2943
3,00	1,00	-,32700*	,03632	,006	-,4788	-,1752
	2,00	-,14250	,03632	,059	-,2943	,0093

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ANEXO 12

Tabla 7. Análisis de variancia-ANOVA de la actividad de las enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler.

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
GMP	Between Groups	13166,461	2	6583,231	149,404	,001
	Within Groups	132,190	3	44,063		
	Total	13298,651	5			
GME	Between Groups	33723,867	2	16861,933	8,913	,050
	Within Groups	5675,555	3	1891,852		
	Total	39399,422	5			
GGF	Between Groups	3,911	2	1,956	9,853	,048
	Within Groups	,595	3	,198		
	Total	4,507	5			
GFF	Between Groups	199391,041	2	99695,521	117,571	,001
	Within Groups	2543,879	3	847,960		
	Total	201934,921	5			
GDH	Between Groups	36999,368	2	18499,684	,827	,518
	Within Groups	67122,635	3	22374,212		
	Total	104122,003	5			

Tabla 8. Comparación múltiple de las enzimas por tejido aplicando prueba de Tukey HSD.

Dependent Variable	(I) factor	(J) factor	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
GMP	1,00	2,00	-26,07500	6,63801	,059	-53,8134	1,6634
		3,00	-109,81000*	6,63801	,001	-137,5484	-82,0716
	2,00	1,00	26,07500	6,63801	,059	-1,6634	53,8134
		3,00	-83,73500*	6,63801	,002	-111,4734	-55,9966
	3,00	1,00	109,81000*	6,63801	,001	82,0716	137,5484
		2,00	83,73500*	6,63801	,002	55,9966	111,4734
GME	1,00	2,00	-23,81000	43,49542	,855	-205,5651	157,9451
		3,00	-169,60000	43,49542	,060	-351,3551	12,1551
	2,00	1,00	23,81000	43,49542	,855	-157,9451	205,5651
		3,00	-145,79000	43,49542	,087	-327,5451	35,9651
	3,00	1,00	169,60000	43,49542	,060	-12,1551	351,3551
		2,00	145,79000	43,49542	,087	-35,9651	327,5451
GGF	1,00	2,00	-,03500	,44551	,997	-1,8967	1,8267
		3,00	-1,73000	,44551	,060	-3,5917	,1317
	2,00	1,00	,03500	,44551	,997	-1,8267	1,8967
		3,00	-1,69500	,44551	,064	-3,5567	,1667
	3,00	1,00	1,73000	,44551	,060	-,1317	3,5917
		2,00	1,69500	,44551	,064	-,1667	3,5567
GFF	1,00	2,00	-49,26500	29,11975	,341	-170,9482	72,4182
		3,00	-408,98000*	29,11975	,002	-530,6632	-287,2968
	2,00	1,00	49,26500	29,11975	,341	-72,4182	170,9482
		3,00	-359,71500*	29,11975	,002	-481,3982	-238,0318
	3,00	1,00	408,98000*	29,11975	,002	287,2968	530,6632
		2,00	359,71500*	29,11975	,002	238,0318	481,3982

GDH	1,00	2,00	155,39500	149,58012	,607	-469,6581	780,4481
		3,00	-20,48000	149,58012	,990	-645,5331	604,5731
	2,00	1,00	-155,39500	149,58012	,607	-780,4481	469,6581
		3,00	-175,87500	149,58012	,541	-800,9281	449,1781
	3,00	1,00	20,48000	149,58012	,990	-604,5731	645,5331
		2,00	175,87500	149,58012	,541	-449,1781	800,9281

*. La diferencia es significativa a partir del 0,05.

Tabla 9. Descriptores de los análisis de la actividad de las enzimas en tejidos de *M. dubia*.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
GMP	1,00	28,5650	,51619	,36500	23,9272	33,2028	28,20	28,93
	2,00	54,6400	6,70337	4,74000	-5,5874	114,8674	49,90	59,38
	3,00	138,3750	9,32674	6,59500	54,5776	222,1724	131,78	144,97
	Total	6	73,8600	51,57257	21,05441	19,7379	127,9821	28,20
GME	1,00	28,0650	15,23815	10,77500	-108,8444	164,9744	17,29	38,84
	2,00	51,8750	2,26981	1,60500	31,4815	72,2685	50,27	53,48
	3,00	197,6650	73,74417	52,14500	-464,9000	860,2300	145,52	249,81
	Total	6	92,5350	88,76871	36,23968	-,6221	185,6921	17,29
GGF	1,00	2,9300	,65054	,46000	-2,9149	8,7749	2,47	3,39
	2,00	2,9650	,16263	,11500	1,5038	4,4262	2,85	3,08
	3,00	4,6600	,38184	,27000	1,2293	8,0907	4,39	4,93
	Total	6	3,5183	,94941	,38759	2,5220	4,5147	2,47
GFF	1,00	50,7100	5,60029	3,96000	,3934	101,0266	46,75	54,67
	2,00	99,9750	7,06400	4,99500	36,5075	163,4425	94,98	104,97
	3,00	459,6900	49,62475	35,09000	13,8293	905,5507	424,60	494,78
	Total	6	203,4583	200,96513	82,04367	-7,4416	414,3583	46,75
GDH	1,00	206,2450	105,71953	55,75500	-743,6073	1156,0973	131,49	281,00
	2,00	50,8500	40,95562	21,96000	-317,1217	418,8217	21,89	79,81
	3,00	226,7250	232,95633	104,72500	-1866,3046	2319,7546	62,00	391,45
	Total	6	161,2733	144,30662	58,91293	9,8328	312,7138	21,89

ANEXO 13

Foto 03. Flujoograma de trabajo

