



INFORME PERIODO 2011-2012

1. APELLIDO: Liggieri

Nombre(s): Constanza Silvina

Título(s): Lic. En Biología (Ecología). Dra. en Ciencias Exactas.

Dirección electrónica: cliggieri@biol.unlp.edu.ar

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría Profesional Asistente Mes: Septiembre Año: 2005

ACTUAL: Categoría: Profesional Adjunto. Sesión Directorio 25/05/10. Acta 1319

Mes: Mayo Año: 2010

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) Nombre del proyecto: "Obtención de compuestos bioactivos naturales, sintéticos y recombinantes mediante el uso de hidrolasas de plantas autóctonas. Evaluación de las propiedades biológicas". Código X-576.

Período de ejecución: 2010-2014

Unidad de ejecución: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE)

Institución de la que depende la unidad de ejecución: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Entidad financiadora: Universidad Nacional de La Plata.

Financiamiento obtenido: Sí

b) Nombre del Proyecto: "Aplicación de fitoproteasas de la flora autóctona en la producción de compuestos bioactivos". Código 02224

Período de Ejecución: 2009-2012

Unidad de Ejecución: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE)

Institución de la que depende la Unidad de Ejecución: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Entidad Financiadora: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología, Presidencia de la Nación. Programa FONCYT (Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica). Resolución del directorio ANPCyT N° 320/2009.

c) Nombre del Proyecto: "Aplicación de la flora nativa en la obtención de compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica". *Nota aclaratoria: hasta la presentación del presente informe, no se ha publicado el código del Proyecto a pesar de haber sido debidamente acreditado.*

Período de Ejecución: 2012-2013

Unidad de Ejecución: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE)

Institución de la que depende la Unidad de Ejecución: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Entidad Financiadora: Universidad Nacional de La Plata.

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s): Caffini, Néstor Oscar

Cargo Institución: Investigador Principal CICPBA. Director del LIPROVE. Profesor Extraordinario
Consulta. Fac. de Ciencias Exactas. U.N.L.P.

Dirección:

C.P:

Tel:

Dirección Electrónica: caffini@biol.unlp.edu.ar

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIProVe)

Dependencia: Departamento de Ciencias. Biológicas. Fac. de Ciencias Exactas. Universidad
Nacional de La Plata.

Dirección: Calles 47 y 115. Ciudad: La Plata. C. P: 1900 Prov: Bs. As.

Tel: (0221) 423 5333/0121 (int. 57).

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre: Fac. de Ciencias Exactas. UNLP

Dependencia: Departamento de Ciencias Biológicas.

Dirección: Calles 47 y 115.

Ciudad: La Plata C. P: 1900 Prov: Bs. As Tel: (0221) 423 5333/0121 (int. 34)

Cargo que ocupa: Jefe de Trabajos Prácticos. Dedicación Simple. Area: Biología, Especialidad:
Biología

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

7.1. Muestra: *Araujia hortorum*

Debido a que colaboro con el estudio de esta especie desde hace algunos años, mencionaré brevemente algunas técnicas que ya han sido informadas en periodos anteriores, y detallaré aquellas que se realizaron durante el presente periodo.

7.1.1. Materiales y Métodos

7.1.1.1. Obtención de las preparaciones enzimáticas

El látex conteniendo las proteasas, se obtuvo practicando incisiones superficiales en los frutos y fue colectado sobre buffer cítrico-fosfato 0,1 M, pH 6,4, conteniendo EDTA y cisteína 5 mM. El EDTA se agregó para impedir la acción de fenoxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo¹ y la cisteína para mantener el medio reductor, evitando de este modo la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas. Se utilizó un buffer con valor de pH alejado del pH óptimo de las peptidasas presentes en la muestra, a fin de minimizar la autodigestión durante los procesos de extracción enzimática.

La suspensión resultante fue centrifugada diferencialmente a $2884 \times g$ durante 30 minutos a 4 °C y luego ultracentrifugada a $37492 \times g$. El sobrenadante resultante, conteniendo la proteína de interés, fue denominado "*extracto crudo*" (EC). Este fue fraccionado y conservado a -20 °C hasta el momento de ser utilizado en estudios posteriores.

7.1.1.2. Determinación del contenido de proteínas

7.1.1.2.1. Método de Bradford

Para determinar la concentración de proteínas del extracto crudo se utilizó el método de Bradford². El mecanismo implica la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas, unión que produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). Las lecturas de absorbancia se realizaron a esta última longitud de onda en un espectrofotómetro Agilent 8453 E (Agilent Technologies). Se utilizó albúmina bovina (Sigma Chemical Co) como proteína patrón.

Tanto los ensayos con la muestra problema como los blancos de reactivo se realizaron por triplicado.

7.1.1.2.2. Método de Lowry

Este método³ se basa en la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con las proteínas. Si bien el mecanismo de reacción no está bien dilucidado, se sabe que la tirosina, y en menor medida la cisteína, la cistina, la histidina y las uniones peptídicas, reaccionan reduciendo al molibdato a azul de molibdeno. La reacción también puede producirse en presencia de tungstato, para generar azul de molibdeno y tungsteno. El complejo da un color azul característico que se mide a 745-750 nm. Los iones Cu^{2+} en medio alcalino facilitan la reacción de reducción del reactivo de Folin formando un complejo con la unión peptídica a través del nitrógeno involucrado en el enlace y reduciéndose a Cu^{1+} . El Cu^{1+} y los residuos involucrados reducen entonces al reactivo de Folin generando el color característico. El rango de detección de proteína de este método es de 50-400 μg de proteína/ml.

7.1.1.3. Medición de la actividad peptidásica

¹ Anderson, J. W. (1968). Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, Volume 7, 1973-1988.

² Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". *Anal. Biochem.* 72:248-254.

³ O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. "Protein measurement with the Folin-Phenol reagents". *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Los ensayos de actividad proteolítica fueron realizados utilizando caseína tipo Hammarsten (Research Organics, Cleveland, OH) como sustrato. Se mezclaron 100 µl de solución enzimática y 1,1 ml del sustrato de caseína al 1 % en un tubo de ensayo colocado en un baño termostatzado a 37 °C. La reacción se detuvo por el agregado de 1,8 ml de TCA al 5 %, los tubos se mantuvieron en frío 30 minutos para lograr una mejor precipitación del sustrato no hidrolizado. Luego se centrifugaron a $2884 \times g$ durante 20 minutos y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm (Abs280). Cada ensayo se realizó por quintuplicado.

Para cada experimento se preparó el correspondiente blanco, mezclando 0,1 ml de solución enzimática, 1,8 ml de TCA al 5 % y 1,1 ml caseína al 1 %, en ese orden. De esta manera se aseguró la inhibición de la enzima antes del agregado del sustrato. Los blancos se realizaron por triplicado.

7.1.1.4. Cálculo de la actividad caseinolítica

La actividad proteolítica se determinó según la ecuación:

$$Ucas = \frac{A_{280}}{t \times V} \times Fd$$

Donde: -Ucas (unidad de actividad caseinolítica) se define como la variación en unidades de absorbancia que produce 1 ml de solución enzimática, debido a los productos de digestión de la caseína solubles en ácido tricloroacético al 5 % (m/V), por minuto, a 37 °C en el buffer de reacción al pH indicado⁴.

-t = tiempo de duración del ensayo de actividad en minutos.

-V = volumen de la solución enzimática ensayada en ml.

-Fd = factor de dilución de la solución enzimática.

7.1.1.5. Obtención de hidrolizados proteicos

El sustrato empleado en los ensayos de hidrólisis fue un concentrado de proteínas (80%) de suero lácteo bovino comercial (Lacprodan 80, Arla Foods Ingredients S. A.)

7.1.1.6. Perfil de hidrólisis de lactosuero bovino en función del tiempo de reacción

A fin de optimizar el ensayo, la primera variable a ajustar fue el tiempo de hidrólisis. El concentrado proteico se disolvió (10 g/l) en agua destilada (pH final: 6,9). Se utilizó una dilución 1/20 en agua destilada de las proteasas presentes en el EC de *Araujia hortorum*.

En varios tubos eppendorf colocados en baño de agua a 40 °C se vertieron 100 µl del EC y 400 µl de sustrato. Se dejó transcurrir la hidrólisis el tiempo necesario (0, 10, 20, 30, 40, 60, 90 y 180 minutos). Se detuvo la reacción por el agregado de 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Para el blanco de sustrato se colocó agua destilada en lugar de la preparación enzimática. Seguidamente se centrifugó durante 15 minutos a $5000 \times g$ en centrifuga Hermle Z323K. El precipitado obtenido se dejó secar en desecador conectado a una bomba de vacío durante aproximadamente 15 minutos; seguidamente se resuspendió en 450 µl de buffer de muestra (ver ítem 7.1.1.8.) Finalmente se llevó a ebullición 15 minutos, se centrifugó a $5000 \times g$ durante 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro eppendorf.

7.1.1.7. Optimización del método para detener la reacción de hidrólisis

⁴ Priolo, N.S., López, L.M.I., Arribére, M.C., Natalucci, C.L., Caffini, N.O. (1991). "New purified plant proteinases for the industry". *Acta Alimentaria*. 20:189-196.

Una vez estipulados los tiempos de reacción, se procedió a optimizar las condiciones de hidrólisis realizando ensayos en pequeña escala. Las mezclas de reacción consistieron en 90 µl de EC y 3,6 ml de sustrato termostatizados a 40 °C. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Se ensayaron distintas condiciones para detener la reacción: shock térmico a temperatura de ebullición durante 5min; cambio de pH mediante agregado de HCl 0,1 N y ultrafiltración en tubos Millipore con membrana con corte de 3000 Da.

En el primer ensayo, luego de transcurrido el tiempo de hidrólisis, se colocó la mezcla en baño termostático a 100 °C durante 5 minutos. Se tomaron muestras de los productos de hidrólisis antes de detener la reacción y luego del shock térmico. Los controles que se realizaron, en las mismas condiciones de ensayo, fueron un blanco de enzima, colocando agua en lugar de EC, y un segundo blanco inactivando el extracto enzimático por shock térmico durante 5 minutos previo al ensayo de hidrólisis. Finalmente se ultrafiltró la mezcla de hidrólisis utilizando dispositivos de ultrafiltrado por centrifugación (Millipore) con una membrana de corte de 3000 Da en una centrífuga refrigerada Hermle Z323K durante 20 minutos, con el objeto de separar los péptidos producto de la hidrólisis enzimática de las proteínas.

Para el segundo método propuesto se realizó el ensayo en idénticas condiciones y se adicionaron gotas de HCl 0,1 N con pipeta Pasteur en cantidad necesaria para hacer descender el pH a 4,5, un valor lejano al pH óptimo de la enzima. Finalmente se ultrafiltró la mezcla como se describió para el primer ensayo. Paralelamente se midió la absorbancia (Abs) a 280 nm en un ensayo control para verificar si las enzimas del EC mantenían su actividad luego de la adición de ácido. Se tomaron muestras a 0, 30, 60 y 90 minutos.

En el tercer y último ensayo, una vez transcurrido los tiempos de hidrólisis (20 y 180 minutos), se procedió a ultrafiltrar rápidamente la mezcla con membrana de corte de 3000 Da utilizando una centrífuga refrigerada. La centrifugación se realizó a 1413 x g, a 8 °C, durante aproximadamente 30 minutos (hasta alcanzar el 50% del volumen del concentrado peptídico). Simultáneamente en todos los casos se realizó un ensayo blanco de sustrato agregando 90 µl de H₂O destilada en lugar de la enzima.

A mayor escala, la hidrólisis se realizó en vaso de precipitados de 50 ml termostatizado a 40 °C. Cada mezcla de reacción consistió en 450 µl de EC y 18 ml del sustrato.

Los péptidos resultantes de la ultrafiltración se guardaron a -80 °C para realizar ensayos posteriores.

7.1.1.8. Análisis electroforético de la hidrólisis enzimática del lactosuero

A fin de seleccionar el mejor método de detención de la hidrólisis se analizó el perfil electroforético de las muestras. en geles de poliacrilamida al 14 y 20% en medio desnaturante (SDS) de acuerdo a la técnica de Laemmli ⁵, con algunas modificaciones.

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad), en placas de vidrio de 7 x 8 cm y separadores de 0,75 mm de espesor. En un primer paso se permitió que el gel de resolución polimerizara y luego se hizo lo propio con el gel de "stacking" o apilamiento. La concentración de poliacrilamida fue del 20 % en el gel de resolución y del 5 % en el gel concentrador (*stacking*). Como buffer de corrida se utilizó Tris-glicina de pH 8,3.

Las muestras a ser sometidas a SDS-PAGE se colocaron en tubos eppendorf conteniendo buffer de muestra sin β-mercaptoetanol y con SDS conteniendo iodoacetato de sodio (50 mM) a fin de evitar la autodigestión y llevando a ebullición (5 minutos). Luego se les adicionó β-mercaptoetanol y se las calentó nuevamente durante 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 5.000×g durante 5 minutos en una centrífuga Hermle Z 323 K utilizando un rotor 22087 V01. Cuando las muestras se calientan en exceso de SDS y un reactivo tiólico, como el β-mercaptoetanol, la mayoría de los polipéptidos unen el SDS en una relación constante

⁵ Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

que depende del peso, de tal forma que la densidad de carga es idéntica y migran en los geles de acuerdo a su tamaño, lo que permite determinar el peso molecular de los polipéptidos separados.

Previamente a aplicar las muestras en el gel, las calles se lavaron dos veces con buffer de reservorio antes de la siembra y luego se aplicaron las muestras (volumen de siembra 10 µl) con jeringa Hamilton.

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean III Dual Slab Cell (Bio Rad). Los reservorios anódico y catódico se llenaron con buffer de reservorio de pH 8,3.

La corrida se realizó en dos etapas de intensidad de corriente constante; la primera etapa, a 20 mA por placa, finalizó cuando el frente de corrida abandonó el gel de stacking; la segunda etapa se corrió a 30 mA por placa evitando superar los 200 V. La electroforesis finalizó cuando el frente de corrida llegó al borde inferior del gel (aproximadamente 45 minutos).

Una vez completada la corrida, los geles se sumergieron durante 12-18 h en la solución colorante (Coomasie Blue) que al mismo tiempo que colorea, fija. Luego fueron decoloradas en sucesivos baños con agua destilada.

Con el fin de estimar las masas moleculares de las diferentes bandas proteicas se sembraron en los geles patrones de bajo peso molecular (P1: rango de 2,5 kDa a 16,94 kDa) y de alto peso molecular (P2: rango de 14,4 kDa a 94 kDa).

7.1.1.9. Determinación del grado de hidrólisis. Método del TNBS

El grado de hidrólisis (GH) representa la proporción de enlaces hidrolizados de la proteína utilizada como sustrato en relación con la misma proteína sin sufrir hidrólisis. Se calcula según la siguiente fórmula:

$$GH = (h/h_{tot}) \times 100$$

Donde h es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína “sustrato”.

Para la determinación del GH se analizó la concentración de grupos aminos libres con el método del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS)⁶,

Los hidrolizados y el blanco (lactosuero) se diluyeron 1:10 en buffer fosfato 0,2125 M, conteniendo 1% SDS, pH 8,2. Las diluciones se incubaron a 75°C durante 15 minutos. Posteriormente se mezclaron 40 µl de muestra diluida, 480 µl del buffer y 160 µl de una solución del reactivo de TNBS diluido 1:200 en agua destilada y preparado en el momento. Los tubos se incubaron a 50°C durante 1 hora al resguardo de la luz, y luego se detuvo la reacción con 640 µl de HCl 0,1N. Se dejó enfriar los tubos en oscuridad durante aproximadamente 60 minutos y finalmente se leyó la absorbancia a 340 nm. Se utilizó leucina como patrón para la construcción de la curva de calibración, con concentraciones 0,225; 0,450; 0,90; 1,125 y 2,25 mM a partir de una solución stock de 4,5 mM. Las diluciones se efectuaron con el mismo buffer fosfato con SDS al 1%. Tanto las determinaciones de los puntos de la curva patrón como las de las muestras analizadas se realizaron por triplicado.

El grado de hidrólisis fue calculado con la siguiente aproximación:

$$GH \% = 100 \cdot [(NH_2 - NH_{20}) / (NH_{2\infty} - NH_{20})]$$

donde NH_2 indica la concentración de grupos aminos libres de la muestra, $NH_{2\infty}$ y NH_{20} se refieren a una muestra hidrolizada completamente y al aislado sin hidrolizar, respectivamente.

7.1.1.10. Determinación de Actividad Biológica mediante el ensayo de la actividad

⁶ Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(6), 1256-62. Retrieved from

inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La actividad inhibitoria de ECA *in vitro* fue medida utilizando el sustrato fluorogénico Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH⁷

Muestras de hidrolizado fueron liofilizadas a sequedad durante 24 horas en liofilizador, luego se resuspendió el sólido en 100 µl de agua bidestilada, concentrando 10 veces la muestra. La actividad inhibitoria de los péptidos generados por hidrólisis fue determinada incubando 3 µl de ECA con 2 µl de una solución de sustrato en DMSO (0,5mg/ml) en presencia de 25 µl de muestra y llevando a un volumen final de 3 ml en una cubeta de cuarzo con buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, conteniendo NaCl 50 mM y Cl₂Zn 10 µM a 37 °C. La reacción se llevó a cabo utilizando un espectrofluorómetro RF-1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) registrando el incremento de la fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$) durante 3 minutos. Como control positivo de inhibición se utilizó un stock de Captopril (1 mM en agua), inhibidor sintético de ECA. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los datos fueron expresados en porcentajes de inhibición (un resultado de 0% corresponde a la mezcla de reacción sin el inhibidor). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7.1.1.11. Aislamiento y purificación de los péptidos bioactivos presentes en los hidrolizados.

Las muestras obtenidas y ultrafiltradas como se describe en el tercer método (ítem 7.1.1.7.) fueron analizadas por cromatografía de fase reversa (RP). Se empleó un equipo ÄKTA purifier compuesto por dos bombas P-900, un detector UV-900 conectado a una computadora personal con software Unicorn 5.11. Para la separación de los péptidos se utilizó una columna C-18 conformada por un cartucho LiChroCART 250-4 con relleno LiChrosphere 100, 5µm (Merck) y sostén para cartucho manu-CART 4 (Merck).

La columna fue equilibrada con TFA 0,1% y los péptidos fueron eluidos a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min utilizando un gradiente lineal de hidrofobicidad creciente hasta alcanzar un 50% de acetonitrilo en TFA 0,1%. Se sembraron 250 µl de la muestra previamente ultrafiltrada empleando una jeringa. El eluato fue monitoreado constantemente a 215 y 280 nm.

7.1.2. Resultados

7.1.2.1. Análisis del Extracto Enzimático

El contenido de proteínas del extracto crudo obtenido a partir del látex de frutos de *Araujia hortorum* fue de 5,4 mg/ml según el Método de Bradford. Utilizando caseína como sustrato se pudo detectar actividad proteolítica en el extractivo. Se calculó la actividad caseinolítica para el mismo que fue de 34 U_{CAS}. Las peptidasas responsables de la mencionada actividad son del tipo cisteínico⁸.

Según lo reportado Obregón y colaboradores⁸ al examinar la actividad peptidásica de la preparación cruda en función del pH, el extracto de *A. hortorum* mostró la máxima actividad entre pH 7,5 y 8,5.

En presencia de caseína como sustrato, la actividad enzimática del extracto crudo aumentó con la temperatura en función del tiempo, llegando a un máximo de actividad a los 60 °C. Por encima de dicha temperatura, entre los 70 °C y 80 °C, el extracto pierde rápidamente su actividad caseinolítica, posiblemente debido a un proceso de desnaturalización proteica y no debido a autólisis. Este comportamiento con la temperatura en presencia y ausencia de sustrato indicaría un

⁷ Carmona, A. K., Schwager, S. L., Juliano, M. a, Juliano, L., & Sturrock, E. D. (2006). A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nature protocols*, 1(4), 1971-6. doi:10.1038/nprot.2006.306.

⁸ Obregón, W.D., Arribére, M.C., Morcelle del Valle, S., Liggieri, C., Caffini, N.O., Priolo, N.S. (2001). "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.* 20:17-25.

rol protector por parte del sustrato⁸.

7.1.2.2. Obtención de Péptidos por Hidrólisis Controlada. Optimización de la reacción de hidrólisis

A fin de optimizar la reacción de hidrólisis, la primera variable en ajustarse fue el tiempo de reacción, para ello se siguió el método de Vairo Cavalli y colaboradores⁹ con pequeñas modificaciones. En las Fig. 1 y 2 se puede observar el perfil de hidrólisis de las proteínas de lactosuero bovino obtenido con el extracto crudo de latex de *A. hortorum*. En éstos ensayos las reacciones se detuvieron mediante el agregado de ácido tricloroacético al 5%. En la calle 2 de la Fig. 1 se observan las bandas correspondientes a las proteínas presentes en el lactosuero bovino, en orden decreciente de masa molecular: lactoferrina, seroalbúmina bovina, inmunoglobulinas, β -lactoglobulina (la banda más intensa) y α -lactoalbúmina.

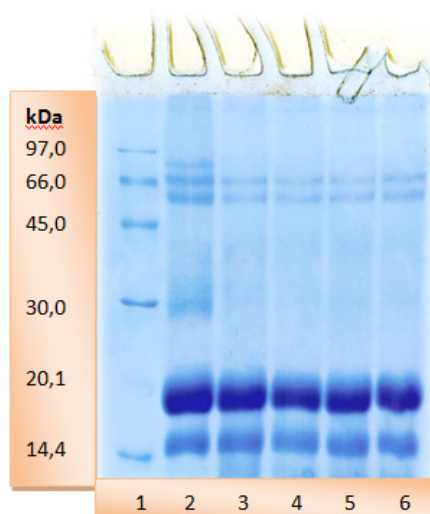


Figura 1. Perfil de hidrólisis de lactosuero bovino. SDS-PAGE al 14%. *Calle1*: marcadores de masa molecular (GE): α – lactoalbúmina (14,4 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), anhidrasa carbónica (30,0 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), albúmina (66,0 kDa), fosforilasa b (97,0 kDa); *calles 2, 3, 4, 5 y 6*: tiempos de hidrólisis 0, 10, 20, 30 y 40 minutos, respectivamente

En base a los resultados mostrados en la Figura 1 se aprecia que la banda perteneciente a la lactoferrina de aproximadamente 80 kDa en las condiciones del ensayo fue hidrolizada en un 79 % luego de 10 minutos de incubación, se hizo menos apreciable luego de 20 minutos, llegando a hidrolizarse completamente a partir de los 30 minutos. En la Fig. 2 se observa que la banda de 66 kDa, correspondiente a seroalbúmina bovina, fue degradada en un 50% luego de los 180 minutos de hidrólisis, mientras que las inmunoglobulinas se hidrolizaron un 60% luego del mismo tiempo de reacción.

⁹ Vairo Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N., & Natalucci, C. (2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers . Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Science*, 2, 1-5. doi:10.1017/S0022029905000749

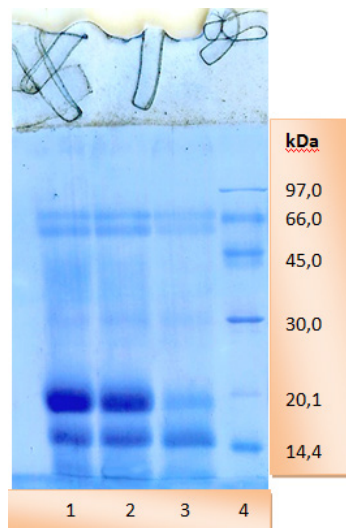


Figura 2. Perfil de hidrólisis de lactosuero bovino. SDS-PAGE al 14%. Calles 1, 2 y 3: tiempos de hidrólisis de 60, 90 y 180 minutos, respectivamente, calle 4: marcadores de masa molecular (GE).

Como se observa en las Figuras 1 y 2, no puede estimarse el porcentaje de hidrólisis de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina de masas 18,4 kDa y 14,2 kDa respectivamente, por lo que se realizó una nueva electroforesis disminuyendo la cantidad de muestra sembrada en cada calle (Fig. 3).

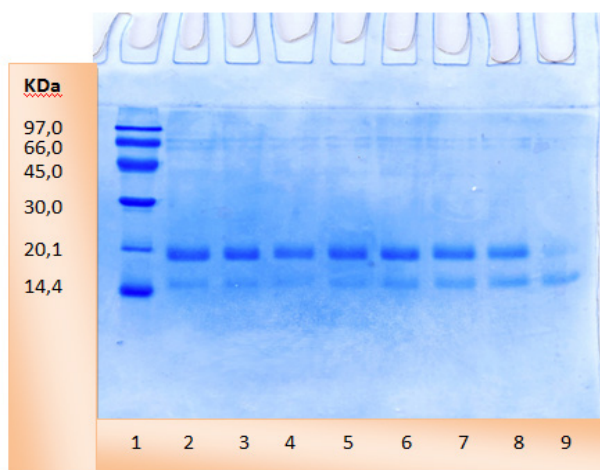


Figura 3. Perfil de hidrólisis de lactosuero bovino. SDS-PAGE al 14%. Calle 1: marcadores de masa molecular (GE), calles 2 a 9: tiempos de hidrólisis de 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90 y 180 minutos respectivamente.

A partir de la Fig. 3 se observa que la banda de 18,4 kDa correspondiente a la β -lactoglobulina fue disminuyendo en intensidad muy levemente con el transcurso del tiempo. La degradación fue del 13% a los 20 minutos de reacción, haciéndose notoria a los 180 minutos con un 75% de degradación. Por otro lado, la banda de 14,2 kDa que corresponde a la α -lactoalbúmina, durante los primeros 20 minutos de hidrólisis se degradó un 30% según los resultados obtenidos por el programa Scion Image, pero luego de los 30 minutos de reacción la banda se intensificó debido probablemente a la aparición de un fragmento de alguna proteína de mayor masa molecular con esta masa.

Dado que no se observan diferencias significativas en el perfil de hidrólisis de 20, 30 y 40 minutos se seleccionó el tiempo 20 minutos y 180 minutos para realizar posteriores ensayos.

Se estudiaron tres procedimientos diferentes para detener la reacción de hidrólisis como fueron descritos en la sección M&M ítem 7.1.1.7..

En primer lugar se ensayó la detención de la hidrólisis del lactosuero luego de transcurrido el tiempo de reacción (20 minutos) por shock térmico (100 °C).

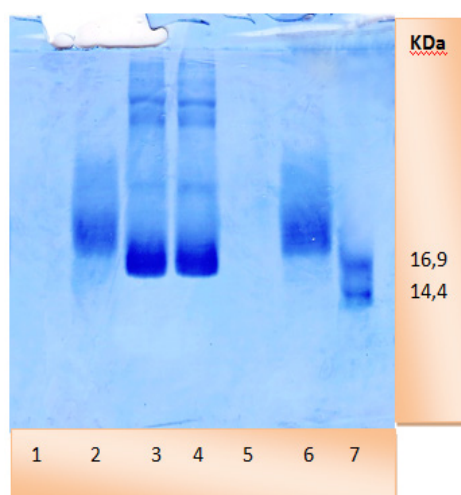


Figura 4. Hidrólisis de lactosuero bovino a 20 min, detenida por shock térmico. SDS-PAGE de 20%. *Calles 1 y 5:* hidrólisis durante 20 min, con posterior detención de la reacción por shock térmico; *calles 2 y 6:* hidrólisis durante 20 min con detención de la reacción por el agregado de buffer de muestra desnaturizante; *calle 3:* blanco de la enzima; *calle 4:* lactosuero con enzima inactivada previamente por temperatura; *calle 7:* marcadores de masa molecular (GE)

En la Fig.4 se muestran los resultados de este ensayo. Si bien el extracto enzimático se inactiva con la temperatura, tal como observa en la calle 4, el calentamiento aumenta la velocidad de reacción en forma descontrolada. La detención de la hidrólisis mediante shock térmico (calles 1 y 5) fue inefectiva, ya que la reacción continuó hasta completar la desnaturalización enzimática. La hidrólisis de 20 minutos fue total y no parcial y controlada como se pretendía. Es importante mencionar que ha sido reportado el uso de tratamientos térmicos para aumentar la susceptibilidad de proteínas de lactosuero como la β -lactoglobulina a la proteólisis enzimática para la producción de péptidos bioactivos¹⁰, lo que también explicaría en parte la hidrólisis descontrolada observada.

Se observó también diferencia en el perfil de hidrólisis cuando la reacción fue detenida por el agregado de buffer desnaturizante, conteniendo β -mercaptoetanol, con respecto al perfil obtenido cuando la reacción se detuvo por el agregado de ácido (Fig. 1 calle 4). Esto se debe probablemente a la activación de las enzimas presentes en el extractivo por el β - mercaptoetanol, tal como ha sido reportado para otras enzimas cisteínicas de la misma familia¹¹.

Descartando el primer método propuesto, se procedió a detener la hidrólisis mediante la modificación del pH de la mezcla de reacción, descendiendo el mismo hasta pH 4,5 adicionando ácido clorhídrico (HCl) 0,1N una vez alcanzado los 20 minutos de hidrólisis, tal como se mencionó en M&M en el ítem 7.1.1.7.. Para tal ensayo fueron requeridos 2,75 ml de ácido.

Paralelamente se realizó otra mezcla de reacción para medir la absorbancia a 280 nm con el tiempo transcurrido luego de detener la reacción, con el fin de corroborar si las enzimas de EC fueron inactivadas por el ácido, tal como se indicó en M&M. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

¹⁰ Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Recio, I., & Amigo, L. (2006). Effect of beta-lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *Journal of chromatography. A*, 1116(1-2), 31-7. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.006.

¹¹ Priolo, N, Morcelle del Valle, S. R., Arribére, M. C., López, L. M. I., & Caffini, N. (2000). Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.*, 19, 39-48.

Tabla 1. Absorbancia a 280 nm de los hidrolizados detenidos con HCl

Tiempo (min)	Abs (280nm)
0	1,1449
30	1,1948
60	1,2493
90	1,3252

A partir de los datos de absorbancia a 280 nm se observa que la misma aumentó a medida que transcurrió el tiempo. De acuerdo a Priolo y colaboradores¹¹ las enzimas presentes en el EC del látex de *Araujia hortorum* son activas en un rango de pH entre 7,5 y 8,5, por lo que a pH 4,5 no mostrarían actividad. En base a los resultados observados podríamos suponer que el agregado de este ácido incrementa la ruptura de las proteínas presentes en el sustrato, lo que produce el aumento de absorbancia. Dado que prosigue la hidrólisis en forma descontrolada éste método fue descartado.

El tercer método propuesto para detener la hidrólisis, mencionado en M&M ítem 7.1.1.7., consistió en ultrafiltrar la mezcla rápidamente luego de los 20 minutos de hidrólisis con membrana de corte de 3000 Da. Un aspecto común de los péptidos inhibidores de ECA no es la presencia de grupos funcionales, sino más bien el pequeño tamaño de los mismos y su C-terminal relativamente hidrofóbico. Esta característica hace de los métodos de fraccionamiento basados en el tamaño como la ultrafiltración, entre otros, una herramienta promisorio en la etapa de pre-concentración de estos péptidos bioactivos¹². La Fig. 5 muestra el análisis por SDS-PAGE de este método que permitió en un único paso detener la reacción mediante separación física de la enzima y obtener un concentrado de péptidos menores de 3000 Da. Ya que por su baja masa no pueden visualizarse los péptidos por SDS-PAGE (calles 4 y 8 de la Fig. 5) éstos se analizaron mediante RP-HPLC.

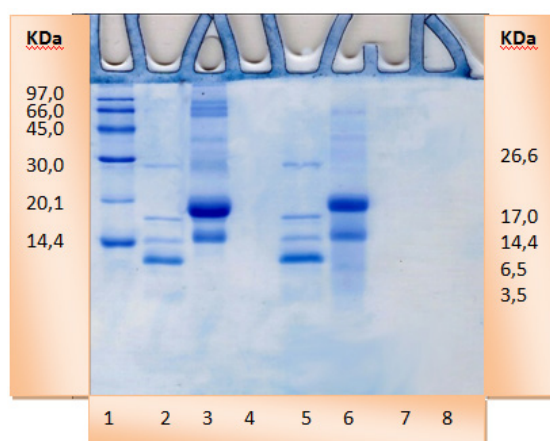


Figura 5. Hidrólisis de lactosuero bovino detenida por ultrafiltración luego de 20 minutos de reacción. SDS-PAGE 20%. *Calle1:* Patrón Low Range (GE); *calle 2 y calle 5:* Patrones multipéptidicos (BioRad): cadena oxidada β de insulina (3,5 kDa), aprotinina (6,5 kDa), α -lactoalbúmina (14,4 kDa), mioglobina (17,0 kDa), triosafosfato isomerasa (26,6 kDa), *calle 3:* lactosuero, *calle 4 y calle 8:* ultrafiltrado de lactosuero, *calle 6:* hidrolizado de lactosuero sin ultrafiltrar, *calle7:* hidrolizado de lactosuero ultrafiltrado.

¹² López-Fandiño, R., Otte, J., & van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16(11), 1277-1293. doi:10.1016/j.idairyj.2006.06.004

7.1.2.3. Determinación del grado de hidrólisis por el método del TNBS

Se determinó el grado de hidrólisis del lactosuero luego de 20 minutos de reacción por acción del EC de *A. hortorum*.

La Fig. 6 muestra la curva patrón obtenida con el estándar de Leucina.

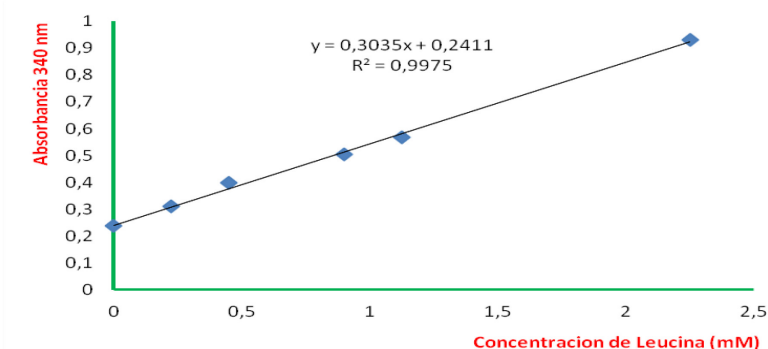


Figura 6. Curva patrón de leucina del método del TNBS

Tal como se indicó previamente el grado de hidrólisis fue calculado mediante la siguiente aproximación:

$$GH \% = 100 \times [(NH_2 - NH_{20}) / (NH_{2\infty} - NH_{20})]$$

A partir de la curva patrón se calculó el valor de la concentración grupos aminos libres NH_2 y NH_{20} de la muestra correspondientes a los tiempos 20 y 0 minutos de hidrólisis, respectivamente. Los mismos fueron 1,22 y 0,62 en cada caso.

El término $NH_{2\infty}$ se estimó utilizando la siguiente fórmula propuesta por Bressani¹³, (1994).

$$NH_{2\infty} = (1/PM \text{ del aa en la proteína}) \times (1 + f_{lys}) \times (\text{concentración de proteína})$$

El grado de hidrólisis fue de 1% de acuerdo a estos cálculos en las condiciones ensayadas, lo que a su vez se ajusta a lo observado por SDS-PAGE.

7.1.2.4. Determinación de Actividad Biológica: Actividad Inhibitoria de ECA

Para obtener un rango de valores de referencia respecto de un inhibidor conocido se realizó un ensayo de inhibición *in vitro* de ECA con distintas concentraciones del inhibidor comercial Captopril. En la Tabla 2 se muestran dos de las concentraciones ensayadas.

Tabla 2. Actividad inhibitoria sobre ECA de Captopril (control positivo de inhibición), lactosuero e hidrolizado de proteínas de lactosuero con EC de *A. hortorum* por 20 y 180 minutos

	% de Inhibición
Blanco de Enzima	0
Captopril 0,1 μ M	74 $\pm$ 4
Captopril 0,01 μ M	40 $\pm$ 6
Hidrolizado 20 minutos	52 $\pm$ 1
Hidrolizado 180 minutos	52 $\pm$ 7
Blanco de Lactosuero	21,9 $\pm$ 0,2

¹³ Bressani, R. (1994). Composition and nutritional properties of amaranth. In O. Paredes-López (Ed.), *Amaranth, Biology, Chemistry and Tecnology* (pp. 185-206). Florida: CRC Press.

Según estos resultados, las muestras hidrolizadas durante 20 y 180 minutos poseen aproximadamente el doble de actividad inhibitoria de ECA que el lactosuero sin hidrolizar. Además estos valores coinciden con los valores de inhibición obtenidos para Captopril con una concentración entre 0,1 y 0,01 μM , que está de acuerdo con los valores observados en bibliografía⁷.

7.1.2.5. Aislamiento y Purificación de los Péptidos bioactivos presentes en los hidrolizados.

Se procedió a la purificación de los péptidos obtenidos mediante cromatografía de fase reversa (RP) empleando un equipo ÄKTA purifier, tal como se describió en la sección en M&M.¹⁴.

Las muestras utilizadas fueron blanco de Lactosuero, hidrolizados de 20 minutos y muestras con 180 minutos de hidrólisis. (M&M 7.1.1.7. tercer método).

En las figuras siguientes se pueden apreciar los gráficos de salida de columna del HPLC para el blanco de Lactosuero y los hidrolizados de 20 y 180 minutos.

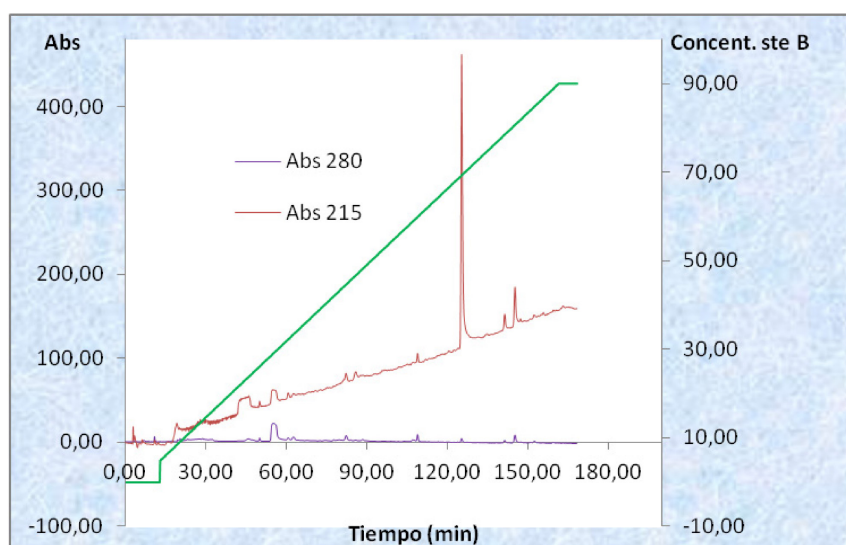


Figura 7. Salida de columna, blanco de Lactosuero. Columna equilibrada con TFA 0,1% (solvente A), gradiente lineal con ACN – Agua (50%- 50%) conteniendo TFA 0,1% (solvente B).

¹⁴ Walsh, D. J., Bernard, H., Murray, B. a, MacDonald, J., Pentzien, a-K., Wright, G. a, Wal, J.-M., et al. (2004). In vitro generation and stability of the lactokinins beta-lactoglobulin fragment (142-148). *Journal of dairy science*, 87(11), 3845-57. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73524-9

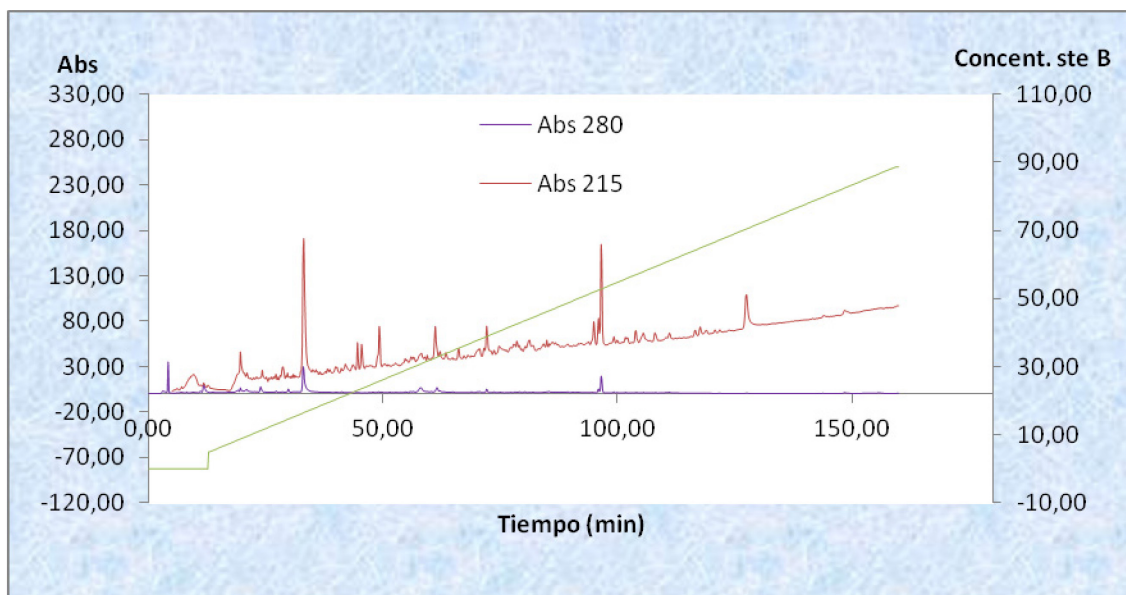


Figura 8. Salida de columna, hidrólisis de 20 min.

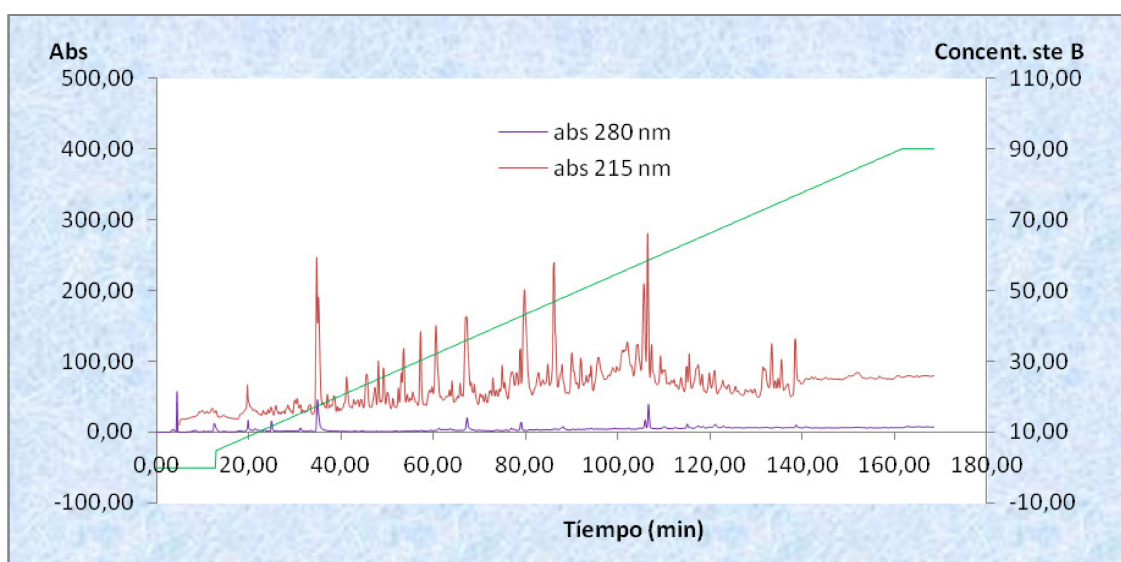


Figura 9. Salida de columna, hidrólisis de 180 min.

Comparando los cromatogramas del blanco de lactosuero (Fig. 7) con el del hidrolizado de 20 minutos (Fig. 8), se observó la presencia de 4 picos importantes en éste último que no aparecían en el blanco. Como era de esperarse el perfil cromatográfico del hidrolizado de 180 minutos (Fig. 9) resultó mucho más complejo. Dado que no se observan diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de ECA de los hidrolizados de 20 y 180 minutos se decidió utilizar el hidrolizado de 20 minutos para los ensayos de aislamiento y purificación de los péptidos bioactivos por ser mucho menos complejo en cuanto a su composición peptídica.

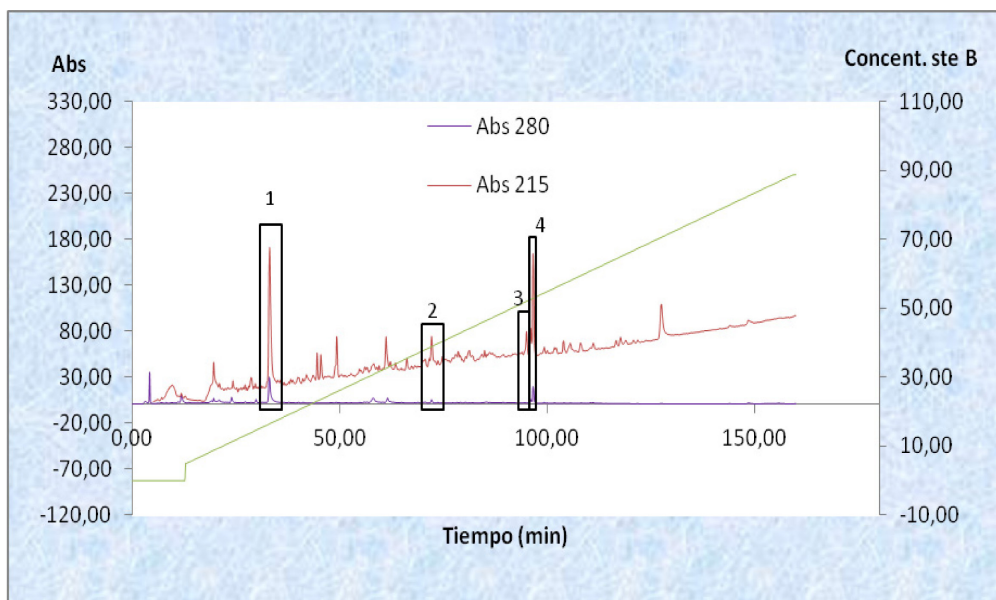


Figura 10. Salida de columna, hidrólisis de 20 min donde se marcan los picos 1, 2, 3 y 4.

El primer pico del hidrolizado de 20 minutos salió a los 32 minutos aproximadamente, cuando el gradiente alcanzó un 8,2 % de ACN, el segundo pico a los 72 minutos con un 19,5 % de ACN, el tercero a los 96 minutos (26% de ACN) y el cuarto pico a los 96,5 minutos (26,4 % de ACN).

Se recolectaron el pico no retenido además de los picos 1, 2, 3 y 4 y se ensayó actividad inhibitoria de ECA a cada uno de ellos. Se pudo observar que la mayor actividad inhibitoria de ECA la retuvo el primer pico. El no retenido presentó también actividad inhibitoria, aún mayor que la que presentó el pico aislado.

Tabla 3. Actividad inhibitoria del no retenido y del pico 1 sobre ECA

	% de Inhibición
No retenido	83 ± 2
Pico 1	$73 \pm 1,5$

La cantidad de proteínas presente en el hidrolizado y el pico aislado se determinó por el método de Lowy tal como se describió en M&M. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración de proteínas en cada muestra por el método de Lowry

Muestra	Concentración de proteínas (µg/ml)
Hidrolizado 20 min	52,03
Pico 1	8,37

7.2. Colaboración en la realización de distintas técnicas de laboratorio

En este apartado se detallan los distintos ensayos que he realizado como colaboración al estudio de las muestras pertenecientes a las especies *Cynara scolymus* y *Cirsium vulgare*.

Como ya he mencionado en el punto 7.1 colaboro con el estudio de esta especie desde el año 2007, es por ello que mencionaré brevemente algunas técnicas que ya han sido informadas en periodos anteriores, y detallaré aquellas que se realizaron durante el presente periodo.

7.2.1. Muestra: *Cynara scolymus* (“alcaucil”, “alcachofa”)

7.2.1.1. Materiales y Métodos

7.2.1.1.1. Obtención de preparaciones crudas

Las preparaciones crudas de las enzimas se obtuvieron macerando en trituradora eléctrica el material vegetal con buffer fosfato potásico 0,1 M, de pH 7 (1:3, p/v), con el agregado de EDTA 5 mM y cisteína 5 mM. Esta extracción se realizó con agitación suave e intermitente y en baño de hielo-agua para prevenir la proteólisis. El agregado de EDTA evita la acción de fenoloxidasas que poseen Cu^{2+} en su centro activo ¹⁵ mientras que la cisteína actúa como agente reductor. Además se eligió un valor de pH de extracción alejado del pH óptimo estimado, con el objeto de minimizar la autodigestión durante el procesamiento de las muestras.

Los extractos crudos fueron filtrados a través de gasa doble y centrifugados a 16000g durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorval, mediante lo cual se removieron las gomas y otros materiales insolubles (película blanquecina que flotaba en la superficie y *pellet* marrón). El sobrenadante se filtró a través de papel y se conservó a -20°C hasta su análisis.

7.2.1.1.2. Cromatografía de exclusión molecular

Este tipo de cromatografía se empleó con la finalidad de eliminar pigmentos y otras sustancias que podrían interferir con ensayos posteriores como proteínas y péptidos de menor peso molecular

Se sembró 1 ml del extracto crudo (EC) conteniendo las enzimas proteolíticas de esta especie en un equipo ÄKTA Purifier conteniendo una columna de exclusión molecular Tricorn 10/50 de, con relleno de Sephadex G-25. Se utilizó un buffer Tris-Bis HCl, 25 mM, pH 6, tetratiónato 0,5 mM. La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min. A cada una de las fracciones colectadas se le determinó la absorbancia empleando un espectrofotómetro Agilent 8453 E (Agilent Technologies). Las longitudes de onda empleadas fueron 260, 280 y 330 nm, que corresponden a la región del espectro UV a la que absorben activamente los ácidos nucleicos, polipéptidos y proteínas ¹⁶ y fenoles, respectivamente. La fracción que presentó mayor absorbancia fue la que se sembró en la cromatografía de intercambio iónico con el objeto de purificar las fracciones con actividad proteolítica (no se muestra el perfil de corrida correspondiente).

7.2.1.1.3. Cromatografía de Intercambio Iónico

Para analizar la muestra seleccionada de la cromatografía de exclusión molecular se utilizó un equipo ÄKTA Purifier usando una columna Hitrap Q HP 5 ml. Se sembraron 0,6 ml de la muestra. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: buffer A Tris-Bis HCl 25 mM pH 6,0, tetratiónato 0,25 mM; buffer B: Tris-Bis HCl 25 mM, pH 6, tetratiónato 0,5 M, ClNa 1 M; gradiente 0-50 % de B en 10 ml.

¹⁵ Anderson, JW. (1968). Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* 7: 1973-88.

¹⁶ Stoscheck C.M. (1990). Quantitation of Protein. A Guide Protein Purification. *Methods in Enzymology* Vol 182 (Deutscher, M.P. ed.). Academic Press, Inc

7.2.1.1.4. Determinación de la actividad enzimática de las proteasas aspárticas presentes en *C. scolymus* mediante tres técnicas diferentes:

a) Actividad coagulante de la leche

Es posible estimar la actividad enzimática observando el tiempo de coagulación de una muestra de leche bajo condiciones definidas de calidad y concentración de sustrato y de temperatura y tiempo de reacción¹⁷.

Preparación del sustrato: se utilizó leche descremada en polvo envasada en sobres de aproximadamente 5 g (San Regim). Se pesó el contenido de un sobre y se preparó una solución al 10 % (p/v) en CaCl_2 10 mM por agregado y mezcla manual hasta obtener una preparación homogénea. La mezcla se llevó a volumen ajustando el pH en 6 y se mantuvo con agitación suave para prevenir la formación de espuma, en agitador magnético durante 30 minutos. El sustrato se mantuvo en heladera hasta su uso, pero no excediendo las 4 horas. Todo el procedimiento se realizó con el sustrato protegido de la luz con una cubierta de papel metalizado a fin de estandarizar las condiciones de preparación del sustrato. La actividad coagulante de la leche de cada una de las preparaciones crudas y de los medios de cultivo se determinaron por los métodos descritos a continuación.

La actividad coagulante de la leche fue realizada según una modificación de la técnica de Arima y colaboradores¹⁸. En un baño de agua a 32 °C se colocaron tubos con 500 µl de extracto crudo a los que se les adicionó 0,5 ml de una solución al 10 % (p/v) de leche descremada en polvo en solución de CaCl_2 10 mM. Con la finalidad de visualizar mejor la formación del coágulo, se introdujo un tubo con tinta azul en el interior del tubo de reacción. El tiempo de coagulación fue determinado por observación directa de la floculación contra el tubo con colorante. La prueba fue realizada por triplicado y como control negativo se adicionó buffer a la solución de leche.

Para expresar la *actividad enzimática* se definió una unidad arbitraria a la que se llamó unidad Rennet (UR). Dicha unidad expresa la cantidad de enzima que coagula 10 ml de leche a 30 °C en 100 segundos, en las condiciones de ensayo¹⁹.

b) Medida de la actividad enzimática utilizando como sustrato Hemoglobina

Se utilizó la técnica de Anson (1938) ligeramente modificada Vairo Cavalli y colaboradores⁹. Para obtener el sustrato (hemoglobina desnaturalizada por acción de HCl) se agitó durante 30 minutos una solución conteniendo 0,5 g de hemoglobina bovina (Sigma) en 20 ml de agua destilada con 2,5 ml de HCl aproximadamente 0,6 N. El pH (pH 4,0) deseado se obtuvo mediante la adición de la cantidad necesaria de NaOH al 2%. La solución se llevó a volumen con agua destilada para obtener una concentración final de 2% en hemoglobina. Filtrar la Hemoglobina antes de usar.

La mezcla de reacción conteniendo 50 µl de la preparación enzimática y 250 µl de la solución de hemoglobina desnaturalizada fue incubada durante 2 hs a 30 °C y la reacción se detuvo por el agregado de 500 µl de ácido tricloroacético al 5%. (Hb+ E+TCA). La mezcla se mantuvo a -4°C toda la noche y se centrifugó durante 20 minutos a 5.000 g. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 280 nm. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco agregando en primer término el ácido tricloroacético (Hb+TCA+E).

Esta técnica se probó en las fracciones resultantes de la cromatografía de intercambio iónico.

¹⁷Dalgleish DG (1992) The enzymatic coagulation of milk. In: *Advanced Dairy Chemistry I: Proteins* (PF Fox, ed.), pp.: 579-619. Elsevier Applied Science. Elsevier Science Publishers Ltd. England.

¹⁸Arima K, Yu J & Iwasaki S (1970) Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. *Meth. Enzymol.* 19: 446-459.

¹⁹Vairo Cavalli, S.; Claver, S.; Priolo, N. y Natalucci, C. 2005. Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research* 72: 271-275.

c) Medida de la actividad enzimática utilizando como sustrato Albúmina.

Debido a que la actividad proteolítica utilizando Hemoglobina como sustrato no dió los resultados esperados se procedió a probar la actividad enzimática empleando la albúmina, como sustrato de la reacción enzimática. Se utilizó la técnica de Chung y colaboradores²⁰.

Se realizaron dos ensayos en diferentes condiciones:

c.1) La mezcla de reacción, conteniendo 50 μ l de la preparación enzimática y 100 μ l de la preparación de albúmina al 1% peso/volumen en 200 mM glicina/HCl pH 3, se incubó una hora a 37 °C. La reacción se detuvo por el agregado de 150 μ l de ácido tricloroacético al 5%. La mezcla se mantuvo en hielo durante 10 minutos y luego se centrifugó a 10000 g por espacio de 20 minutos. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 280 nm. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco agregando en primer término el ácido tricloroacético.

c.2) La mezcla de reacción conteniendo 50 μ l de la preparación enzimática y 200 μ l de la preparación de albúmina al 1% peso/volumen en 200 mM glicina/HCl pH 3 se incubó dos horas a 37 °C. La reacción se detuvo por el agregado de 250 μ l de ácido tricloroacético al 5%. La mezcla se mantuvo en hielo durante 10 minutos y luego se centrifugó a 10000 g por espacio de 20 minutos. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 280 nm. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco agregando en primer término el ácido tricloroacético.

7.2.2.2. Resultados

En la siguiente figura se muestra el perfil cromatográfico de la fracción de mayor absorbancia obtenida de la cromatografía de exclusión molecular (ítem 7.2.1.1.2.).

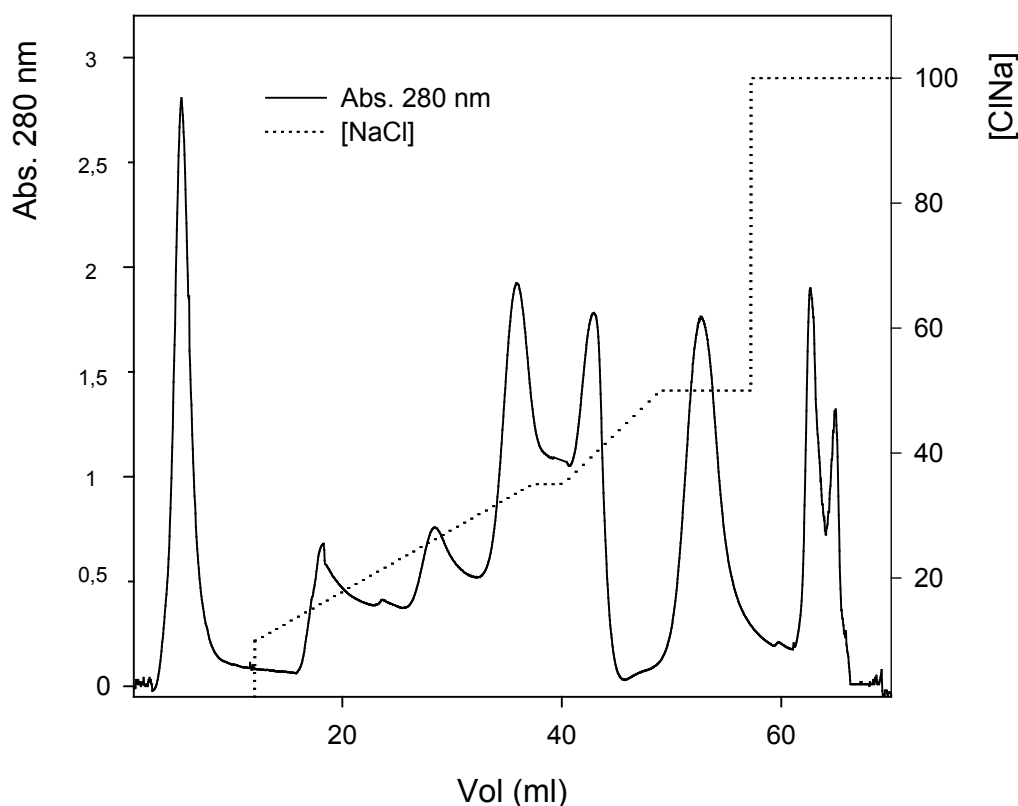


Figura 11. Cromatografía de Intercambio Iónico de *C. scolymus*

²⁰ Chung-II An, Ei-ichiro Fukusaki, Akio Kobayashi (2002). Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* : Vol.214 (5): 661-667.

En la cromatografía se observa que se obtuvieron 7 fracciones cuyas absorbancias a 280 nm estuvieron comprendidas en un rango de 0,6-1,8 nm, aproximadamente. A dichas fracciones se les determinó la actividad coagulante de la leche.

Con respecto a la determinación de la actividad enzimática de las proteasas aspárticas presentes en el extracto crudo de *C. scolymus*, dicha actividad dio positiva ya que coagularon la leche, que se utilizó como sustrato, en 2 minutos obteniéndose un valor de 0,0083 UR/ml.

En cuanto a las fracciones colectadas de la cromatografía de intercambio iónico (ítem **7.2.1.1.3.a**) tuvieron actividad coagulante de la leche, aunque con tiempos de coagulación muy largos. Esto pudo haberse debido a la existencia de una importante autodigestión y las enzimas, de este modo, fueron desnaturalizadas no pudiendo actuar específicamente sobre el sustrato y formar el coágulo correspondiente. Es por ello, que se decidió probar con otras técnicas de determinación de actividad proteolítica con el objetivo de evidenciar dicha actividad de una manera más eficiente. Debido a sus largos tiempos de coagulación y confirmando que esta técnica no era adecuada para dicho fin, no se calcularon las unidades Rennet. Las muestras fueron guardadas en freezer a -80 °C para la realización de posteriores ensayos.

Cabe aclarar que esta técnica, además de ser cuantitativa, es cualitativa. Es decir, es muy útil para emplearla cuando se prepara un extractivo a partir del material vegetal de partida y confirmar que dicho extracto posee enzimas de tipo aspárticas por la formación del coágulo. Con este resultado las preparaciones crudas pueden ser utilizadas para probar distintos ensayos en los cuales es importante la presencia de este tipo de enzimas.

En la técnica empleada para la determinación de la actividad enzimática utilizando la hemoglobina como sustrato (ítem **7.2.1.1.3.b**), no se obtuvieron los resultados esperados ya que en todas las repeticiones del ensayo, los blancos de reacción dieron valores muy altos con lo cual se debió descartar este ensayo para cuantificar la actividad enzimática.

En cuanto a la determinación de la actividad proteolítica utilizando como sustrato a la albúmina (ítem **7.2.1.1.3.c**), tal como había sucedido en los casos anteriores, no dio los resultados esperados. En este caso también dieron muy altos los blancos de la reacción, con lo cual la reacción deja de ser confiable. Frente a estos resultados, se pensó que dichos resultados fueron consecuencia de la baja concentración del ácido tricloroacético (5%) que se utilizó para detener la reacción, lo cual impedía que precipitaran las proteínas que no habían alcanzado a ser hidrolizadas por las proteasas. Para comprobar si esto era cierto, se diseñó un nuevo ensayo en el cual se probaron tres concentraciones más de ácido tricloroacético (10, 15 y 20%) y manteniendo la misma concentración de albúmina que en el ensayo anterior (1%). Lamentablemente, tampoco en este caso dieron los resultados esperados debido a que los blancos de reacción volvieron a dar altos.

Se intentó por último, repetir el ensayo de actividad frente a la albúmina aumentando tanto la cantidad de sustrato como el tiempo de incubación al doble que en el ensayo inicial, permitiendo de este modo que las enzimas presentes en la muestra tuviesen mayor probabilidad de reaccionar con su sustrato. Los resultados tampoco fueron satisfactorios para poder determinar la actividad enzimática ya que, si bien los blancos de reacción no dieron altos como en los casos anteriores, las muestras ensayadas tuvieron valores similares a los blancos, con lo cual no se pudo sacar una conclusión confiable.

Luego de comprobar que ninguna de estos ensayos para medir la actividad enzimática dieron resultados favorables se evaluará los pasos a seguir con relación a la medición de la actividad enzimática de esta especie .

7.3. Muestra *Cyrsium vulgare*

Seguimiento de la Purificación de PSI por Electroforesis en Geles de Tricina

La purificación del PSI, dominio presente en proteínas del tipo de las proteasas aspárticas, y la evaluación de dicha purificación por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según Laemli⁵, fueron informados en el informe correspondiente al periodo anterior (2010-2011). Debido a los resultados observados en dicha electroforesis, se llegó a la conclusión que esta técnica es insuficiente para resolver proteínas de peso molecular inferiores a 10 Kda. Es por ello

que durante el presente periodo se empleó la técnica de geles de tricina según Shagger and Von Jagow²¹, Esta se fundamenta en que la tricina es utilizada en el buffer catódico como 'trailer ion' permitiendo así una mejor resolución de proteínas pequeñas a una concentración de acrilamida menor que en el caso de utilizar el clásico buffer Tris-glicina. Se obtiene una mejor resolución especialmente en el rango 5-20 Kda sin la necesidad del uso de urea. Los geles fueron coloreados siguiendo la técnica de coloración (Coomasie Blue G-250²²) pero su sensibilidad no fue suficiente para observar bandas visibles correspondientes a proteínas pequeñas del orden de los ng (no se muestra la electroforesis correspondiente).

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1. PUBLICACIONES, CAPITULOS DE LIBROS, COMUNICACIONES, ETC.

8.1.1. PUBLICACIONES DE TRABAJOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Maria Alicia Corrons, Juan Ignacio Bertucci, **Constanza Silvina Liggieri**, Laura María Isabel López, Mariela Anahí Bruno. "Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases" LWT - Food Science and Technology Vol 47 Issue 1 (2012) 103-109. ISSN 0023-6438.

8.1.2. COMUNICACIONES A REUNIONES CIENTÍFICAS

8.1.2.1. Mariela A. Bruno; Cecilia V. Cimino, Walter D. Constanza S. Liggieri. Propuesta de mejora de la articulación entre la Educación Media y la Educación Superior. Congreso Metas Educativas 2021. 19 al 21 de Octubre de 2011. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. El trabajo ha sido aprobado y recomendado para su publicación (adjunto mail como probanza). Aclaración: por razones que no nos fueron informadas el Congreso fue suspendido hasta el año 2012 y hasta la fecha de entrega del presente informe aún no hemos recibido ninguna notificación de su realización.

8.1.2.2. Corrons María A., Bertucci, Juan I., Liggieri, Constanza S., Bruno, Mariela A. Obtención de hidrolizados de proteínas lácteas empleando un extracto de *Maclura pomifera*. Detección de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA). XIII Congreso Cytal. 4to Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. II Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. 19 al 21 de octubre de 2011. Libro de resúmenes Sección 4-23.

8.1.2.3. Obregón, W.; Lufrano, D.1; Colombo, M.L.; Liggieri, C.; Vairo Cavalli, S. Análisis proteómico de un sustituto vegetal de rennet. VIII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2011 A realizarse los días 13, 14 y 15 de noviembre de 2011. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. Libro de resúmenes Sección 4-42.

²¹ Shagger and Von Jagow, Analytical Biochemistry 166, (1987), 368-379

²² http://www.nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/80

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

9.1. CARGO: Jefe de Trabajos Prácticos, interino por concurso de antecedentes, dedicación simple

Área Biología Básica y Aplicada. Especialidad: Biología. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.

9.2. TAREA DOCENTE DE GRADO

En el presente periodo hubo un cambio en la modalidad del dictado de la asignatura. Se implementó un curso con una modalidad de dictado aplicando un enfoque constructivista y empirista. Se partió en cada módulo, en lo posible de conocimientos previos que tenían los alumnos respecto al tema a discutir. Se abordó la clase con una dinámica tipo taller, dando algún texto de trabajo o consigna que dispere una discusión. Se hizo hincapié sobre todo en el sustento experimental de cada teoría o modelo tratado, remarcando sus limitaciones. Los docentes a cargo de la clase desarrollaron alguna cuestión conceptual a lo largo de las horas de discusión, sin embargo se abandonó la diferencia entre seminario y teoría, aplicando en principio durante esas 5 horas la misma aproximación metodológica.

Para llevar a cabo estos cambios se realizaron una serie de actividades previas a la implementación de los mismos que se resumen a continuación:

1- Estructuración del curso de acuerdo a un desarrollo de contenidos acorde a la modalidad pretendida.

2- Elaboración de un cronograma de desarrollo temático acorde a la modalidad pretendida.

3- Elaboración de guías de discusión para cada uno de los módulos.

4- División en equipos docentes que desarrollarán el curso completo en cada comisión a fin de discutir los puntos sobresalientes de cada módulo a dictar.

La nueva estructura de cursada se divide en 5 bloques temáticos, dos a ser desarrollados en la primer parte de la cursada (Introducción a la Biología y Organización funcional y estructural del citoplasma celular) y tres a ser desarrollados en la segunda parte de la cursada (Organización funcional y estructural del núcleo celular; Herencia y Evolución).

Se plantea a su vez un cambio clave en la modalidad de la cursada, manteniendo una división en dos tipos de actividades: los trabajos experimentales y actividades de discusión tipo seminario/taller. El dictado del curso se pudo realizar ya que existió una participación activa de los alumnos en todas las clases, para ello la modalidad introducida será de trabajo grupal y exposición, dando lugar para la discusión de temas/consignas que incluyan conceptos críticos a desarrollar pero basada en conocimientos/conceptos previos que trae el alumno y en base a material entregado por la cátedra. El cambio de modalidad de dictado debió ser articulado en forma simultánea en todas las comisiones, para lo cual se realizaron actividades/talleres de discusión entre los docentes de la cátedra y el trabajo en equipos docentes que estuvieron a cargo de cada comisión. En cuanto a la *Evaluación* se mantuvo un esquema de dos evaluaciones parciales, correspondientes a dos partes de la cursada. El contenido y modalidad de las evaluaciones fueron acordes a la modalidad de ejercitación y discusión de conceptos realizados durante las clases.

10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.

10.1. CO-DIRECCIÓN TESINA DE GRADO. FAC. DE CIENCIAS EXACTAS. U.N.L.P.

Codirección de la alumna Julia Martin para obtener el grado de Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular que corresponde a la asignatura Laboratorio de Procesos Biotecnológicos (Trabajo Final. Título: “Identificación de inhibidores peptídicos de proteasas con potencial aplicación biomédica obtenidos a partir de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad “Malcacha”) perteneciente al último año de la carrera. El mismo se realizará en las instalaciones del LIPROVE (Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales) perteneciente al departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. (Expediente en trámite)

10.2. ACTIVIDADES DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Directora del Proyecto de Extensión: “Un acercamiento al mundo de las proteasas vegetales” (Expte. 700-007569/000-2010, resolución N° 1454/11). Este Proyecto se encuentra enmarcado dentro del “Programa de Experiencias Preuniversitarias” de la Facultad de Ciencias Exactas de la U.N.L.P. Se desarrolla con un conjunto de alumnos del 6^{to} Año de la Escuela de Educación Media N° 14 "Carlos Vergara" y del Colegio Lincoln (DIPEGEP N° 4044) ambas ubicadas en la ciudad de La Plata, Pcia de Buenos Aires. Responsable de la organización general, armado y desarrollo del proyecto: elección del temario, preparación y dictado de clases, preparación y puesta a punto de los trabajos prácticos y seminarios. Septiembre Noviembre de 2011.