

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Estudio (BE15)

PERIODO 2015-2016

1. APELLIDO: Mazzer

NOMBRES: Matías Ernesto

Dirección Particular: Calle:

Localidad: Quilmes **CP:** 1879 **Tel:**

Dirección electrónica (donde desea recibir información): matiasmazzer@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

BIOSÍNTESIS DE FLOXURIDINA Y DERIVADOS MEDIANTE BIOCATALIZADORES MULTICATALÍTICOS NANOESTABILIZADOS.

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: Fecha de iniciación: 01/04/2015

2º AÑO: Fecha de iniciación:

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: Fecha de iniciación:

2º AÑO: Fecha de iniciación:

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Quilmes

Facultad:

Departamento: Ciencia y Tecnología

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: R. Sáenz Peña N°: 352

Localidad: Bernal **CP:** 1876 **Tel:** 43657100

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Rivero, Cintia Wanda

Dirección Particular: Calle:

Localidad: Quilmes **CP:** 1878 **Dirección**

electrónica: cwrivero@gmail.com

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

En el año de beca se han desarrollado distintos avances en el marco de la biocatálisis y los procesos sustentables, de acuerdo al plan de trabajo propuesto. Debido en parte a los altos costos de la obtención de compuestos antitumorales y a la generación de residuos implicada en los procesos químicos, se propuso desarrollar una alternativa que tuviera como prioridad el diseño de metodologías eco-eficientes y la alta selectividad de los productos finales.

En la primer mitad del año, se llevó a cabo una búsqueda de lipasas de origen bacteriano a partir de un screening de más de 30 cepas provenientes del cepario interno del LIBioS.

Se evaluó la capacidad hidrolítica de microorganismos de distintos géneros (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*) mediante un método colorimétrico basado en la hidrólisis de p-nitrofenil palmitato (sustrato específico de lipasas). Se seleccionaron los microorganismos que presentaron actividad lipásica en el sobrenadante de cultivo, se calcularon las unidades enzimáticas (UI/ml) y se realizaron cinéticas de crecimiento para determinar el tiempo óptimo de cultivo en el que se detectó mayor actividad.

El screening concluyó con el hallazgo de 2 cepas con actividad lipasa (*Aeromonas salmonicida* spp. y *Staphylococcus aureus*). Los sobrenadantes de cultivo se concentraron mediante técnicas de precipitación, tales como precipitación con sulfato de amonio y acetona. Seleccionándose la primera debido a que fue la técnica más eficiente en términos de proteína total/actividad remanente.

A fin de utilizar la proteína purificada en reacciones de acetilación de nucleósidos (cuya condición necesaria es actividad de agua igual a cero), esta fue sometida a liofilización hasta evaporación total del agua remanente. Los extractos crudos y parcialmente purificados fueron evaluados por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) para verificar el peso molecular de las lipasas identificadas.

Adicionalmente, los extractos precipitados se sometieron a un proceso de inmovilización por adsorción en un soporte octil-sepharosa, lo que permitió preservar la actividad enzimática durante tiempos prolongados. De esta manera, las proteínas cuya actividad en solución era de 2 semanas aproximadamente, conservaron la misma durante al menos 2 meses.

Por otro lado, para determinar las condiciones óptimas de acetilación de Floxuridina se evaluaron distintos análogos de este nucleósido y agentes acilantes de diferente naturaleza. A su vez, se ensayaron distintas condiciones de reacción, como por ejemplo, distintos tipos de solventes, diferentes temperaturas y concentraciones de dador de acilo.

El análogo utilizado en estas reacciones fue Timidina, la cual posee un grupo metilo en el carbono 5' de la base. Además, al igual que la Floxuridina tiene 2 oxhidrilos libres (en las posiciones 3' y 5' de la ribosa) propensos a ser atacados por un nucleófilo. La eficiencia de la reacción depende en la mayoría de los casos de ciertos parámetros como la naturaleza del agente acilante (nucleófilo), la especificidad de la enzima, la solubilidad de los reactivos, entre otros.

Cabe destacar que como modelo enzimático se utilizó la lipasa B de *Candida antártica* (conocida comercialmente como Novozyme 435) cuya versatilidad fue provechosa para los objetivos planteados. Esta enzima demostró tener especificidad hacia el oxhidrilo 5'. Por lo tanto, con el uso de este biocatalizador se estableció un método rápido y eficiente para el seguimiento de la reacción por cromatografía en capa delgada (CCD) y se optimizaron las condiciones de corrida para la cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

A su vez, se evaluaron distintas condiciones de reacción, como dadores de acilo de diferente longitud de cadena lipídica, agregado de co-solventes y concentraciones variables de catalizador y sustrato.

Adicionalmente, mediante la utilización de un HPLC con colector de fracciones, y debido a los altos costos de la floxuridina, se llevó a cabo un protocolo de separación de la misma y posteriormente de concentración por Speed-Vac.

A la finalización del año de beca, se llegó a obtener un fragmento por SDS-PAGE correspondiente a la banda enzimática de interés, con el objetivo de una futura secuenciación por MALDI-TOF. Por otra parte, se comenzaron a evaluar los procesos de inmovilización de microorganismos por atrapamiento (en alginato y/o acrilamida) para la obtención de Floxuridina de manera biocatalítica y su posterior modificación mediante las lipasas seleccionadas purificadas, como un proceso tipo batch.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

- 51° Reunión anual SAIB (Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular). "Selective acylation of antitumoral compounds by novel bacterial lipases"

Mazzer, M.; Cappa, V.; De benedetti, E.; Trelles, J.; Rivero, C. Mar del Plata. 3-6 de Noviembre/2015. Modalidad: Póster.

- 2° Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires (CIC). "Acetilación selectiva de compuestos antitumorales con lipasas" Mazzer, M.; Rivero, C.; Trelles, J. Teatro Argentino, La Plata. 1 de Octubre/2015. Modalidad: Póster.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

14. TÍTULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario