



INFORME PERIODO 2012-2013

1. APELLIDO: Liggieri

Nombre(s): Constanza Silvina

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

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

3.1. Participación como Co-Directora en Proyectos Acreditados de Investigación Científica

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: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CEPROVE)

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

Aclaración: debido a la baja en la Dirección de este Proyecto de la Dra. Nora Priolo, fueron designadas las Dras. Bruno Mariela como Directora y Liggieri, Constanza como Codirectora del mismo a partir del 01/05/2013.

3.2. Participación en el Grupo Responsable de Proyectos Acreditados de Investigación Científica

NOMBRE DEL PROYECTO: "Desarrollo de cosmeceúticos conteniendo péptidos antioxidantes obtenidos por acción de fitoproteasas de la flora autóctona". Código: PICT-2013-2531. Categoría "Plan Argentina Innovadora 2020" Tipo A. Res. N° 214/14 y 539/13.

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2014-2017

UNIDAD DE EJECUCIÓN: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CEPROVE)

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).

3.3. Participación como colaboradora en Proyectos Acreditados de Investigación Científica

-NOMBRE DEL PROYECTO: "Síntesis de péptidos bioactivos de interés alimenticio y farmacéutico, utilizando fitoproteasas autóctonas.". Código PICT-2012-1129.

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2012-2015

UNIDAD DE EJECUCIÓN: Laboratorio de Bromatología.

INSTITUCIÓN DE LA QUE DEPENDE LA UNIDAD DE EJECUCIÓN: Instituto de Física Aplicada (INFAP). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)- Universidad Nacional de San Luis (UNSL).

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 141/13.

Financiamiento obtenido: Sí

-NOMBRE DEL PROYECTO: "Aplicación de la flora nativa en la obtención de compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica". Código: X-613 (Resolución 617).

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2012-2013

UNIDAD DE EJECUCIÓN: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CEPROVE)

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.

-NOMBRE DEL PROYECTO: "Aplicación de fitoproteasas de la flora autóctona en la producción de compuestos bioactivos". Código 02224

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2009-2012. Prorrogado hasta junio del año 2013.

UNIDAD DE EJECUCIÓN: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CEPROVE)

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.

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s): Caffini, Néstor Oscar

Cargo Institución: Ex-Investigador Principal CICPBA. Director del LIPROVE. Profesor

Extraordinario Consulto. Fac. de Ciencias Exactas. U.N.L.P.

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CeProVe). Cambio de Categoría de Laboratorio a Centro. Resolución del HCD de la Fac. de Ciencias Exactas de la UNLP (11°

Reunión fecha: 29/05/14).

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

En el período informado se llevaron a cabo las actividades que se detallan a continuación:

7.1. Especie *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad “Malcacha” (nombre vulgar: papa andina)

Los *objetivos* de esta investigación fueron caracterizar bioquímicamente a los extractos vegetales de esta especie, detectar su actividad inhibitoria de proteasas, diseñar una matriz de afinidad para inmovilizar tripsina en soportes de glioxil-agarosa y purificar cromatográficamente inhibidores de proteasas (IPs) utilizando los soportes de afinidad diseñados previamente.

7.1.1. Materiales y Métodos

7.1.1.1. Obtención y caracterización del extractivo crudo

Se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum*, subespecie *andigenum*, variedad “Malcacha”.

La preparación del extracto crudo (EC) se realizó manteniendo las condiciones de extracción a bajas temperaturas durante todo el proceso de obtención y aislamiento proteico, dado que al ocurrir la desintegración se genera un aumento de temperatura y provocaría la desnaturalización de los inhibidores buscados. Así, los tubérculos de las papas fueron lavados, cortados y pelados en trozos pequeños, y procesados según se detalla:

a) 161 gr. de papas cortadas fueron trituradas en mezclador (mixer), a baja velocidad adicionando Dicloro Difenil Tricloro etano (DTT) 0.2 mM (para prevenir la oxidación de polifenoles) y agua bien fría al medio de extracción. Luego se sedimentó el almidón mediante incubación por 30 minutos en heladera. El sobrenadante (SN) fue centrifugado a

1956 x g durante 60 minutos a 4°C usando una centrifuga Hermle Z323K. Posteriormente se transvasaron los SNs y se procedió a centrifugar a 13527 g, durante 1 hora a 4°C. Este nuevo sobrenadante se filtró (orange Sci PES de 0.2 micrómetros) con jeringa BD Plastipak de 1 ml. Se recogió el SN para su almacenamiento en freezer a – 80°C. La solución obtenida se la llamó Extracto Crudo a (ECa).

b) 95.03 gr de papas cortadas fueron trituradas en mezclador (mixer), a baja velocidad con DTT 10 mM, PVP 1.5 %P/V y EDTA 5mM (ambos reactivos previenen la oxidación de polifenoles) en un volumen final de 200 ml. Al igual que en el protocolo anterior, se sedimentó el almidón, por incubación en heladera, durante 30 minutos. Se realizó una primera centrifugación, durante 15 minutos a 1956 x g a 4°C y una segunda centrifugación por 60 minutos a 13527 g. Se recogió el SN para su almacenamiento en freezer a – 80°C, al que denominamos ECb.

Para la *cuantificación de proteínas del extracto*, se procedió al uso del método de Bradford¹.

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 0,2-1,4 mg/ml para el ensayo estándar y en el de 25-200 µg/ml para el micrométodo. Las diluciones respectivas se realizaron con cloruro de sodio 0,15M con el fin de mantener la fuerza iónica.

En el protocolo seguido para el Macrométodo, se mezclaron 50 µl. de cada una de las muestras (ECb y cada uno de los tratamientos térmicos), se agitó en vórtex y a los 10 min se leyó la absorbancia a 595 nm.

Para la determinación de la actividad inhibitoria se utilizaron como blanco específico proteasas comerciales y proteasas obtenidas y caracterizadas en nuestro laboratorio. Para ello se emplearon araujiana y papaína (proteasas cisteínicas), carboxipeptidasa A (metalo-carboxipeptidasa) y tripsina (proteasa serínica).

7.1.1.1.1. Determinación de actividad inhibitoria de proteasas cisteínicas

- *Actividad inhibitoria de papaína usando PFLNA como sustrato*

El PFLNA (L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilida) es un sustrato cromogénico específico para tiol proteasas. Las tiol proteasas hidrolizan al PFLNA con la liberación de p-nitroanilina, estimada espectrofotométricamente por su absorbancia a 410 nm. El residuo fenilalanina en la posición P2 de PFLNA cumple con las exigencias de

¹ Bradford, M.M. (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.

especificidad de las tiol proteasas². La mezcla de reacción estaba compuesta por 150 µl de ECb, 850 µl de buffer de fosfatos 0,1M; pH 6,5; KCl 0,3M; EDTA 0,1mM y DTT 3mM, 5 µl de Papaína de *Carica Papaya* (Roche) 4,5e⁻⁸ dilución 1/100 y 5 µl PFLNA 0,75Mm diluido con DMSO. Los blancos de reacción se realizaron preincubando el buffer, la enzima y el inhibidor, durante 5 minutos, previo a la lectura de absorbancia.

La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 180 segundos a 37°C. La inhibición se manifestó por la *no hidrólisis* del sustrato específico sintético por parte de la papaína.

- *Actividad inhibitoria de araujiaina usando PFLNA como sustrato*

Se utilizó la enzima *Araujiaína* proveniente de la especie *Araujia hortorum*, procediéndose con el mismo protocolo que para la actividad inhibitoria de papaína.

- *Actividad inhibitoria de papaína usando caseína como sustrato*

Se empleó caseína, tipo Hammarsten (Research Orgánicos, Cleveland, OH, USA), como sustrato para la determinación de la actividad enzimática de las proteasas contenidas en el extracto crudo. La mezcla de reacción consistió en 300 µl de ECb, 1100 µl de Caseína conteniendo Cys 12 mM en Tris-Hcl 0.1 M pH 8,1 y 100 µl de la enzimas Papaína 4,5e⁻⁸M (1/300).

El extracto crudo se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con la solución de papaína. Posteriormente la reacción se llevó a cabo en baño termostático a 42 °C, y se detuvo 20 min después por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Cada tubo de ensayo fue centrifugado a 3.000 x g durante 30 min., y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm³. Para expresar la actividad enzimática se definió una unidad arbitraria a la que se llamó unidad caseinolítica (Ucas). Dicha unidad caseinolítica expresa la cantidad de proteasa que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones del ensayo⁴.

- *Actividad inhibitoria de araujiaina usando caseína como sustrato*

Se siguió el mismo protocolo que con papaína.

²Filippova, I.Yu., Lysogorskaya, E.N., Oksenoit, E.S., Rudenskaya, G.N,Stepanov, V.M. (1984). "L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide -A chromogenic substrate for thiol proteinase assay". *Anal. Biochem.* **143**:293-297.

³ Arribére, M.C., Cortadi, A.A., Gattuso, M.A., Bettiol, M.P., Priolo, N.S., N.O. Caffini, (1998). "Comparison of *Asclepiadaceae* latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. cysteine peptidases". *Phytochem. Anal.* **9**: 267-273.

⁴ Priolo, N., Morcelle del Valle, S., 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**:39-49.

7.1.1.1.2. Determinación de actividad inhibitoria de proteasas serínicas

A los ECb se les realizaron determinaciones de actividad inhibitoria de proteasas serínicas utilizando tripsina como patrón de seguimiento, y usando BAPNA (N-benzoil-arginina-p-nitroanilida) como sustrato de la proteasa. La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 180 segundos a 37°C. La inhibición se manifestó por la no hidrólisis del sustrato específico sintético por parte de la tripsina.

El medio de reacción estaba constituido por 1,2 ml de buffer Tris-Hcl 0,1 M, CaCl₂, 50Mm pH=8, 20 µl.de Tripsina; 100 µl de sustrato, BAPNA 20 mM y 300 µl. de extracto crudo (ECb).

7.1.1.1.3. Determinación de actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasas

Se utilizó en este caso como proteasa blanco Carboxipeptidasa A (CPA) de páncreas bovino (Sigma-Aldrich) de concentración $7,0 \times 10^{-9}$ M.

Para verificar que el EC de papa posee actividad inhibitoria de CPA se incubó a 37°C, 1,4 ml de buffer de reacción (Tris-HCl 20mM NaCl 0,5 M pH 8,0) con 100 µl de ECb de Malcacha y 15 µl de la solución de CPA durante 3 minutos. Seguidamente se agregaron 15 µl del sustrato específico AAFP [N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, de color naranja] en concentración 10 mM.

A continuación se detalla el medio de reacción: 100 µl de buffer de reacción Tris-Hcl 20mM,NaCl,0,5M,pH=8; 100µl de ECb; 1400 µl de solución de CPA $7,09 \times 10^{-9}$ y 15µl de AAFP 10 mM. La reacción se llevó a cabo a 37°C. La actividad fue registrada durante 3 min por el descenso de la absorbancia a 350 nm (la hidrólisis del sustrato produce la desaparición del color naranja) durante 120 s.

El sustrato AAFP es un sustrato típico para este tipo de metalocarboxipeptidasas⁵.

7.1.1.1.4. Caracterización proteica

Para caracterizar a las proteínas mediante métodos electroforéticos, ya sea para la determinación de masas moleculares o puntos isoeléctricos, así como también para verificar la estabilidad de los inhibidores en condiciones extremas de pH o fuerzas salinas, entre otras, muchas veces es necesario concentrar la muestra para optimizar las

⁵ Mock DM (1996). Biotin. In: Present Knowledge in Nutrition. Ziegler EE, Filer LJ (Eds.), 7 th Edition. ILSI Press, Washington, pp 220-235.

condiciones de trabajo. Así, para realizar la concentración proteica de las mismas se utilizaron la liofilización y la precipitación acetónica en frío.

La caracterización proteica de las muestras se realizó por medio de electroforesis e isoelectroenfoque empleando los métodos de Laemmli⁶ y Westergaard⁷, respectivamente.

7.1.1.1.5. Estabilidad de los inhibidores de proteasas frente a distintos pHs

Se evaluó su estabilidad frente a soluciones de distintos valores de pH para verificar si conservaban su actividad o se alteraban en ciertos intervalos del mismo. Para ello se emplearon buffers de Goods⁸, utilizándose para ello, como material de estudio, los tratamientos térmicos de 65°C (TT65), los cuales mantienen a los inhibidores nativos liberando un gran porcentaje de proteínas contaminantes.

Es sí que, al tratamiento térmico a 65°C se lo preincubó por 30 minutos a temperatura ambiente con buffer de Goods de distintos pHs: 2.1; 4.3; 6.95; 8.1; 9.25; 11.2.

Luego se midió actividad inhibitoria de tripsina, para ver cómo se veía afectada la misma, es decir cuan estable frente a los distintos pHs era el inhibidor. La mezcla de reacción estaba compuesta por 1.18 ml de buffer Tris Hcl, 0.1 M CaCl₂-2H₂O 50 mM, pH =8; 20 µl de Tripsina y 50 µl de BAPNA [10mM] utilizado como sustrato.

7.1.1.1.6. Estabilidad de los inhibidores frente a distintas fuerzas iónicas

Se utilizó sal de cloruro de sodio de diferentes concentraciones y como material de partida, el tratamiento de 65°C (TT65°C), por las mismas razones citadas anteriormente.

A 50 µl del tratamiento térmico a 65 °C se lo preincubó por 30 minutos a temperatura ambiente, con 200 µl de cada una de las siguientes concentraciones de NaCl: 0,05 M; 0,15 M; 0,25 M; 0,5; 1 M y 2 M.

Luego, se midió actividad inhibitoria de tripsina para ver cuán estable era dicho inhibidor. La mezcla de reacción contenía 1,18 ml de buffer Tris Hcl, 0.1 M CaCl₂-2H₂O 50Mm, pH =8, 20 µl de Tripsina y 50 µl del sustrato BAPNA [10mM].

⁶ Laemmli U K, (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680- 685.

⁷ Westergaard, J.L., Hackbarth, C., Treuhaft, M.W., Roberts, R.C. (1980). "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures". *J. Immunol. Meth.* **34**:167-175.

⁸ Good, N.E., Izawa, S. (1972). "Hydrogen ion buffers". *Meth. Enzymol.* **24**:53-68.

7.1.1.2. Purificación de los inhibidores

La purificación de los inhibidores de la muestra se realizó por medio de una cromatografía de afinidad utilizando tripsina inmovilizada. Esta enzima se inmovilizó en un soporte agarosa 4 BLC (Hispanagar). Dicho soporte debió ser previamente activado por la adición de grupos aldehído para que éstos reaccionen con los residuos aminoácidos de la enzima⁹.

Las condiciones de inmovilización del gel obtenido fueron las siguientes: 4° C, pH 10, con bicarbonato de sodio 100 mM y NaBH₄ para reducir los grupos aldehídos libres. La tripsina se adicionó en una relación de 45 mg de proteína/g de agarosa en un volumen total de 25 ml. Este soporte conteniendo a la enzima inmovilizada, atrapada mediante uniones covalentes (base de Schiff entre el grupo amino libre de la proteína y el grupo aldehído de la glioxil-agarosa), puede ser reutilizado en muchas aplicaciones ya que se ha demostrado que la enzima permanece unida y activa. Para comprobar el proceso de inmovilización de la tripsina, se fueron recolectando alícuotas a distintos tiempos (0, 5, 20, 40, 60, 120 t 180 minutos) y a dichas fracciones se les realizó una medida de actividad enzimática con el sustrato BAPNA (ítem 7.1.1.1.2.). Una vez que se comprobó que el relleno es activo se procedió a evaluar si la muestra (extracto crudo de Malcacha) poseía actividad inhibitoria sobre el inmovilizado de tripsina.

Para ello se incubó la enzima inmovilizada con el sustrato en buffer de reacción hasta que la lectura de la absorbancia se mantuvo con una pendiente constante (se mantenía una concentración de sustrato saturante). Luego se agregó in situ 50 µl de muestra y se observó si la pendiente se mantenía constante o iba disminuyendo hasta caer a cero. Cuando la pendiente caía a cero, se comprobaba entonces que la muestra inhibía la proteasa inmovilizada, por lo tanto, ese relleno pudo ser utilizado posteriormente para ensayos de cromatografía de afinidad.

También el ensayo se pudo hacer por incubación previa de la tripsina inmovilizada junto con 50 ul de la muestra, y luego se agregó a lo último el sustrato, de esta manera si no se observaba aumento de absorbancia significaba que el extracto inhibía a la proteasa inmovilizada.

⁹ Guisan, J.M.,Penzol,G.,Armisen,P.,*et al.* (1997). Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. Reduction of esteric problems.In: Immobilizationof enzymes and cells, Methods in Biotechnology, vol I, (Bickerstaff, G.F.,ed),Human Press Inc.,Totowa,NJ,pp.261-275.

7.1.2. Resultados

7.1.2.1. Elección del medio de extracción para la obtención del Extracto Crudo

De los dos procedimientos seguidos para la obtención del extracto crudo, se seleccionó el segundo de los nombrados en el ítem 7.1.1.1.b), debido a que el ECa resultó empardecido por la oxidación de los polifenoles. De este modo, se obtuvo un extracto crudo (ECb) mucho más clarificado, presentando una muy buena actividad inhibitoria frente a las proteasas blanco estudiadas.

La concentración de proteínas obtenidas por el método de Bradford para el ECb fue de 929,49 ug/ml.

7.1.2.2. Evidencia de la presencia de inhibidores de proteasas

7.1.2.2.1. Ensayos de inhibición proteolítica

7.1.2.2.1.1. Actividad inhibitoria de cisteín proteasas

a) Frente a papaína usando como sustrato PFLNA

Cuando el ECb fue incubado en presencia de papaína, se observó una disminución total de la actividad proteolítica de dicha enzima (Fig. 1). Lo cual indicaría que el ECb presenta moléculas inhibitoras de cisteín proteasas.

El porcentaje de inhibición, respecto del control, fue de un 99 %.

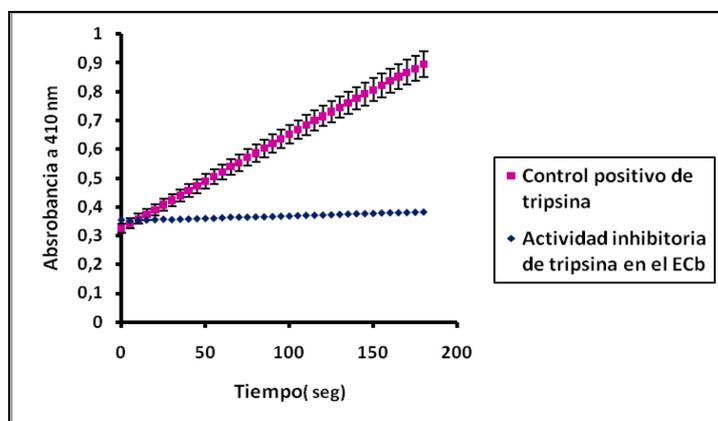


Figura 1: Actividad inhibitoria frente a papaína. En color rosa se muestra la curva control, que corresponde a la actividad de la papaína con el sustrato (PFLNA), sin inhibidor (ECb). En color azul, se grafica la curva que corresponde a la actividad de la papaína con el sustrato (PFLNA) pero en presencia del inhibidor (ECb).

b) Frente a araujaína usando como sustrato PFLNA

Diferente fue el comportamiento de la muestra en este caso ya que al realizarse la medida de actividad inhibitoria para la proteasa araujaína, no se observó actividad inhibitoria. Se modificó el protocolo para determinar si la ausencia de inhibición se debía a una alta concentración de enzima para la cantidad de extracto agregada o si la concentración de

sustrato era muy alta. Sin embargo, a pesar de las modificaciones realizadas, no se verificó actividad inhibitoria.

c y d) Frente a papaína y araujaína usando como sustrato caseína

Cuando el extracto crudo se incubó tanto con araujaína como con papaína usando como sustrato caseína, no se observó actividad inhibitoria en esas condiciones.

De los resultados obtenidos se puede dilucidar que araujaína no es inhibida por el ECb de Malcacha. Es importante aclarar que tanto araujaína como papaína hidrolizaron a la caseína, en ausencia del extracto crudo.

Por tal motivo, la única evidencia de la presencia de inhibidores de cisteín proteasas en el ECb fue demostrada por medio del ensayo de papaína utilizando PFLNA como sustrato (ítem *a*).

7.1.2.2.1.2. Actividad Inhibitoria de serín proteasas

Actividad Inhibitoria de Tripsina con BAPNA:

El ECb presentó muy buena actividad inhibitoria de serín proteasas utilizando como proteasa modelo a la tripsina (Figura 2). La incubación del ECb con la tripsina presentó una menor pendiente (2.65×10^{-4}), respecto a la curva control de tripsina (3.4×10^{-3}). Es decir, que al incubarse la enzima en presencia del extracto crudo, los inhibidores presentes en el mismo produjeron una disminución en la actividad de la tripsina que justifica la diferencia entre dichas pendientes. En cambio cuando no hay incubación de la enzima con la muestra, ésta hidrolizó el sustrato observándose un intenso color amarillo.

En este caso el porcentaje de inhibición, fue del 95 %.

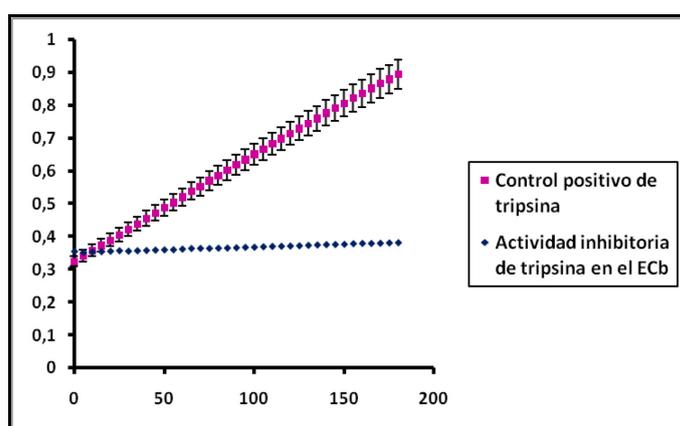


Figura 2: Actividad inhibitoria frente a tripsina. En color rosa se muestra la curva control, que corresponde a la actividad de la tripsina con el sustrato (BAPNA), sin inhibidor. En color azul, se observa la curva que corresponde a la actividad de tripsina con el sustrato (BAPNA) en presencia del inhibidor (ECb de Malcacha).

7.1.2.2.1.3. Actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasas

El ECb presentó una buena actividad inhibitoria de CPA en las condiciones de ensayo realizadas. La incubación del EC con la CPA presentó una menor pendiente (-0.1121) respecto a la curva control de CPA (-0.2575) tal como se observa en la figura 3. Es decir, que al incubarse la enzima en presencia del extracto crudo, los inhibidores presentes en el mismo produjeron una disminución en la actividad de la CPA que justifica la diferencia entre dichas pendientes. En cambio cuando no hay incubación de la enzima con el EC, ésta hidrolizó el sustrato color naranja completamente. Por lo tanto, el porcentaje de inhibición fue de 56 %.

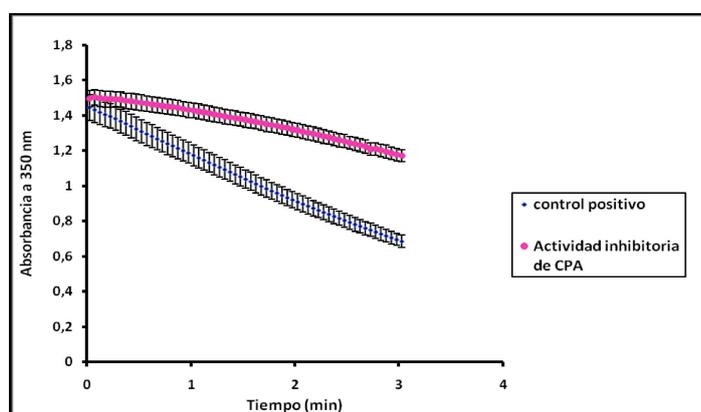


Figura 3: Actividad inhibitoria frente a CPA. En color azul se muestra la curva control, que corresponde a la actividad de la CPA en presencia del sustrato (PFLNA), sin inhibidor (ECb). En color rosa, se muestra la curva que corresponde a la actividad de la CPA pero en presencia del inhibidor (ECb).

Los ensayos de inhibición de proteasas realizados arrojaron una significativa actividad inhibitoria del extracto crudo. Esto indica que la muestra presenta una gran cantidad de este tipo de moléculas. Los porcentajes de inhibición fueron altos para todas las enzimas (ya sea papaína, carboxipeptidasa A o tripsina), se decidió seguir el análisis con los inhibidores de tripsina debido a que la enzima y sus sustratos se encuentran disponibles en el laboratorio y además están ampliamente descriptos en bibliografía.

7.1.2.3. Perfil electroforético del EC

Se realizó una electroforesis desnaturalizante del extracto crudo para ver la distribución de tamaños de los componentes proteicos presentes en el ECb. La figura 4 muestra dicha distribución.

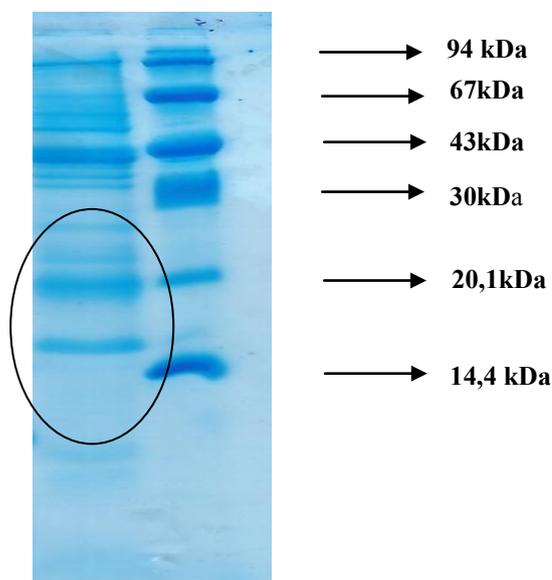


Figura 4: SDS-PAGE del extracto crudo de *S. tuberosum* subespecie *andígena* variedad Malcacha. Calle 1: ECb. Calle 2: Patrón de bajo peso molecular (14KD a 94KDa)

Se puede observar en la figura que los pesos moleculares de los componentes proteicos abarcan masas moleculares desde 3000 hasta 100000 Da. Los inhibidores de proteasas (IPs) presentes en los tubérculos de papa generalmente presentan un tamaño molecular que comprende desde los 4300 Da hasta los 24000 Da¹⁰. De esta manera se puede inferir a priori que las bandas indicadas con un círculo en el SDS-PAGE corresponderían a los inhibidores presentes en el ECb.

Como habíamos mencionado anteriormente, los IPs son termolábiles por lo que se pueden inactivar, en mayor o menor grado, por acción de tratamientos térmicos. Sin embargo, estos inhibidores son más estables térmicamente que, por ejemplo, la patatina, principal componente del tubérculo de papa, que por encima de los 50°C comienza a insolubilizarse fuertemente¹⁰.

La estabilidad térmica de los IPs depende de su peso molecular y de la cantidad de enlaces disulfuro formados en la molécula, cuya presencia en los inhibidores genera estructuras compactas que estabilizan la forma activa del inhibidor frente a elevados cambios térmicos.

¹⁰ V. Bártová, J. Bárta. (2008). Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice. *Res. Agr. Eng.* **54** (4): 170–175.

Por este motivo se procedió posteriormente a un proceso de clarificación de las restantes proteínas mediante diferentes tratamientos térmicos, y de esta forma poder analizar la estabilidad de los inhibidores buscados frente a la temperatura.

Los resultados obtenidos de los ensayos realizados al ECb demostraron que el mismo no mostró actividad inhibitoria usando como proteasa a la araujíaina y como sustrato PFLNA; mientras que, frente a papaína presentó un porcentaje de inhibición de 99 %. Del mismo modo, no presentó actividad inhibitoria usando como proteasas araujíaina y papaína y como sustrato caseína. Sin embargo, exhibió actividad inhibitoria de CPA utilizando como sustrato AFFP dando un valor porcentual de 56 % y de tripsina empleando como sustrato BApNA obteniéndose un porcentaje de inhibición de 95 %. Finalmente, mediante la caracterización electroforética, se pudo identificar a priori la presencia de inhibidores en la muestra.

7.1.2.4. Purificación parcial del extracto crudo por tratamiento térmico

Se incubó el ECb a distintas temperaturas para finalmente evaluar la actividad inhibitoria y la concentración proteica residual en cada uno de los tratamientos térmicos.

7.1.2.5. Determinación de concentración proteica de los TTs por el método de Bradford

El ECb se incubó a 60°C, 65°C, 70°C, 80°C y 100°C durante 30 min. Posteriormente dichos tratamientos se reservaron en heladera por espacio de 20 min. Luego se centrifugó durante 60 min en frío (4°C) a una velocidad de 10000 x g. Se descartaron los pellets y se recolectó cada sobrenadante por separado. En este paso se podía observar a simple vista que la clarificación era más notable en los tratamientos térmicos a mayores temperaturas. Esta observación fue coincidente con la determinación de la concentración proteica por el método de Bradford, cuyos datos se muestran en la tabla 1.

Muestra	Concentración proteica ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
EC	987,86
TT60	503,12
TT65	452,24
TT70	422,24
TT80	419,18
TT100	406,55

Tabla 1: Concentración de proteínas del ECb y de los distintos tratamientos térmicos

7.1.2.6. Actividad inhibitoria residual luego de cada tratamiento térmico

A cada uno de los TTs se le evaluó su actividad inhibitoria de tripsina y los resultados comparativos se observan en la figura 5. En ella, se aprecia que la actividad enzimática de tripsina disminuye hasta un 5% respecto de la actividad control, cuando se la incuba frente al ECb y al tratamiento térmico a 60°C. Cuando la enzima es incubada frente a TT65 la actividad se mantiene en un 20% de la original. En cambio los TT70, TT80 y TT90 no afectan en demasía a la actividad de tripsina, manteniendo una actividad residual del 80%, 85% y 95 % respectivamente. Así, el tratamiento térmico a 65°C es un buen método para usar como etapa de purificación ya que retiene un porcentaje significativo de la actividad inhibitoria de tripsina (inhibidores) y elimina gran cantidad de otras proteínas contaminantes. Esto último fue confirmado tanto por el método de Bradford como por SDS-PAGE.

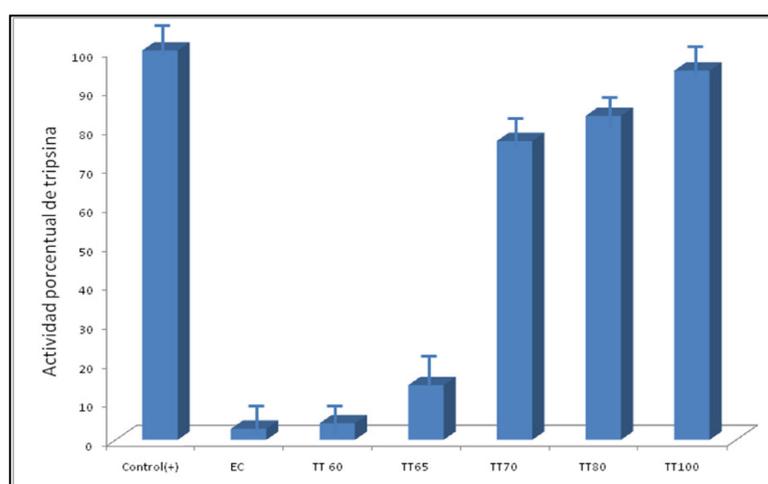


Figura 5: Actividad porcentual de tripsina frente al EC sin tratar y los EC resultantes de los tratamientos térmicos. Control positivo: Tripsina en presencia del sustrato sintético BAPNA; EC: Extracto crudo de Malcacha + tripsina + BAPNA. TT60/TT65/TT70/TT80/TT100°C: EC tratado a las distintas temperaturas + tripsina + BAPNA.

7.1.2.7. SDS-PAGE de los tratamientos térmicos

La figura 6 muestra el perfil de tamaños moleculares del ECb y de los distintos tratamientos térmicos.

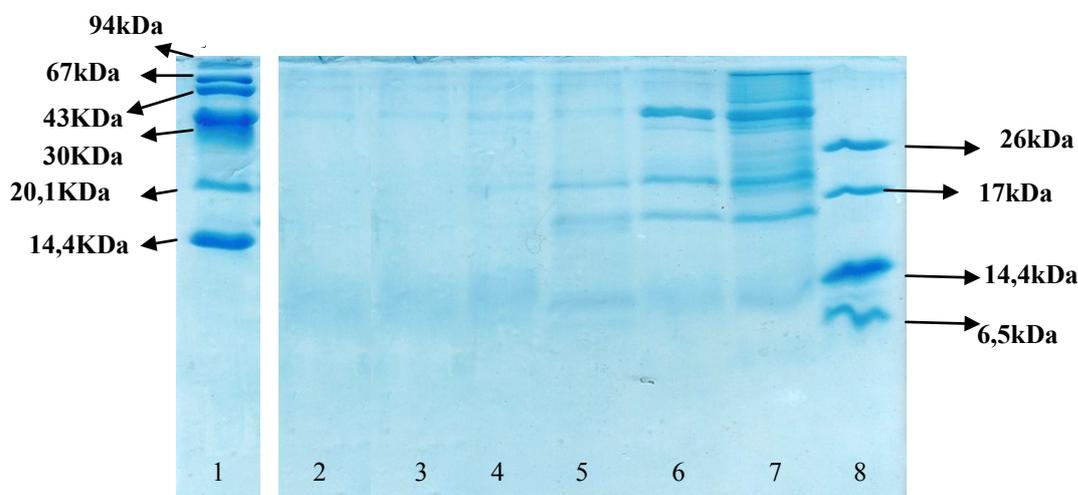


Figura 6: SDS-PAGE. Calle 1: Patrón de bajo peso molecular (14 a 94 kDa). Calle 2: Tratamiento térmico del EC a 100°C. Calle 3: Tratamiento térmico del EC a 80°C. Calle 4: Tratamiento térmico del EC a 70°C. Calle 5: Tratamiento térmico del EC a 65°. Calle 6: Tratamiento térmico a 60°C. Calle 7: EC sin tratar térmicamente. Calle 8: Patrones muropeptídicos (6,5 a 26 kDa).

Como puede observarse en el SDS-PAGE, a medida que aumenta la temperatura del tratamiento térmico al que es expuesto el ECb, se logra una mayor clarificación del mismo. Estos resultados siguen la misma tendencia de los obtenidos para la determinación de la concentración de proteínas (tabla 1) y los de actividad inhibitoria residual (figura 5). Según los datos obtenidos tanto el TT65 como el TT60 resultarían materiales óptimos para continuar con los estudios de este tipo de inhibidores.

7.1.2.8. Estabilidad de los inhibidores de tripsina frente al pH

Para evaluar cuál es el efecto causado en los posibles inhibidores de tripsina frente a distintos cambios de pH, se incubó el tratamiento a 65°C con los distintos buffers de Goods (pH 2-11) a temperatura ambiente, 30 minutos. Luego se evaluó la actividad inhibitoria residual sobre tripsina. Tal como se expresó anteriormente, se eligió el TT65°C, ya que es una muestra más limpia de proteínas que el extracto crudo original, que nos posibilita evaluar y caracterizar mejor a nuestra muestra de inhibidores. Los resultados se pueden observar en la figura 7.

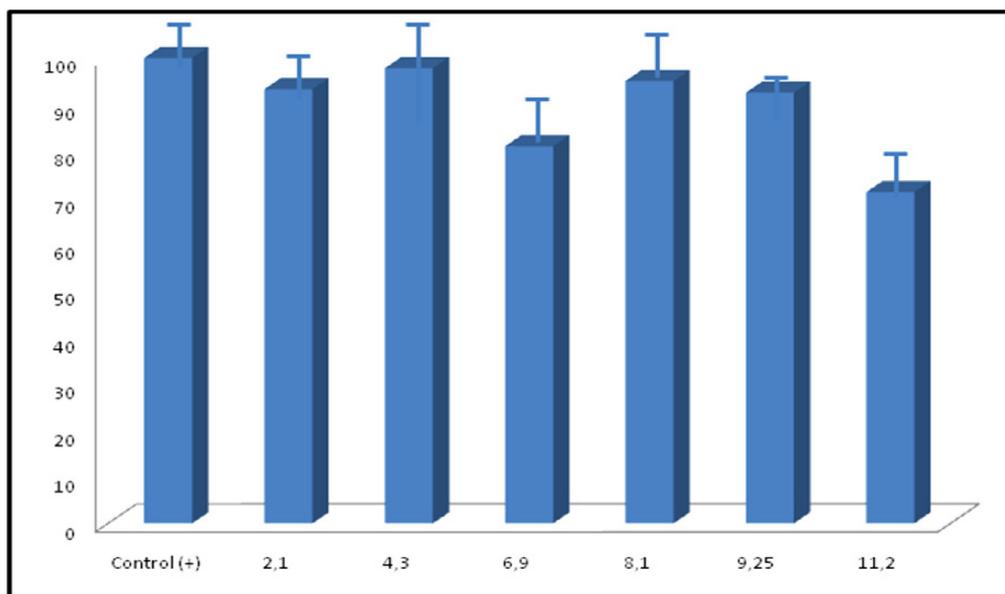


Figura 7: Actividad inhibitoria de tripsina en función del pH. Control positivo: TT 65°C en presencia de tripsina y BAPNA. pH 2,1/pH4, 3/pH6, 9/pH 8,1/ pH 9,25 y pH 11,2: TT 65°C incubado previamente con el buffer de Good del pH correspondiente + tripsina+ BAPNA.

Se puede ver en la figura que la actividad inhibitoria de tripsina se mantiene aproximadamente constante en un rango de pH de 2 a 8. Sin embargo en el valor de pH 11,2 la actividad decrece, aunque no significativamente. Esto comprobaría la gran estabilidad que poseen los inhibidores de serín proteasas frente a un intervalo de pH de 2-11,2.

7.1.2.9. Estabilidad de los inhibidores de tripsina frente a distintos entornos de fuerza iónica

Para seguir con la caracterización de los inhibidores de tripsina, y observar cómo se ven afectados por variaciones en su entorno iónico, se incubó el tratamiento térmico de 65°C con distintas concentraciones de NaCl. Luego se midió la actividad inhibitoria de tripsina, para comprobar si la misma se mantenía estable. Los resultados se pueden ver en la figura 8.

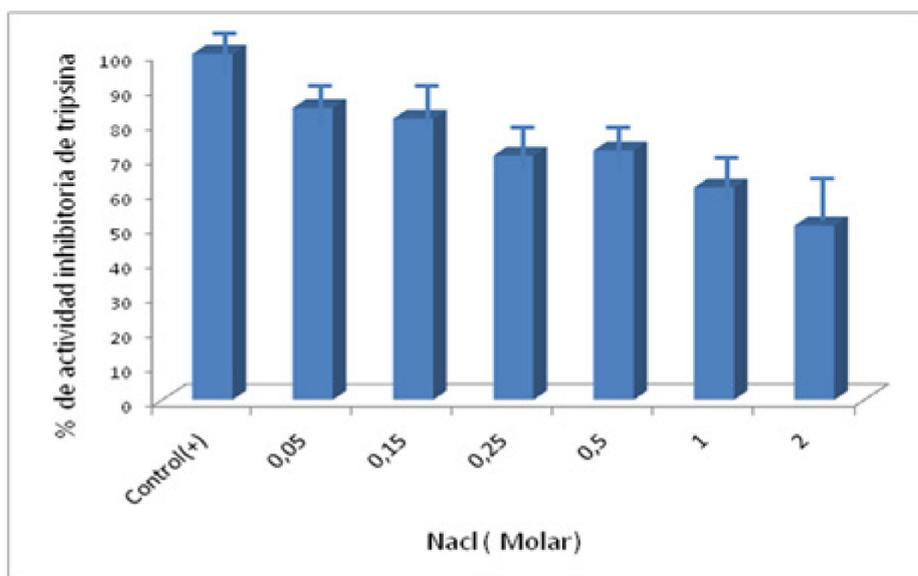


Figura 8: Actividad de tripsina en función de distintas concentraciones de NaCl. Control positivo: T.T a 65°C, en presencia tripsina y BApNA. 0, 05/ 0,15/0,25/0,5/1 y 2M: T.T a 65°C incubado 30 minutos con la concentración de NaCl respectiva en presencia de tripsina y BAPNA.

Puede verse en la figura 8 que, aunque no se aprecian diferencias importantes en los valores de actividad residual de tripsina, cuando el TT65 es sometido a altas concentraciones salinas (1M y 2M), comienza a afectarse en gran medida la estabilidad de los inhibidores presentes en dicho tratamiento térmico. De igual manera, no se llega a perder más del 50% de actividad inhibitoria. En cambio concentraciones molares menores que 0,5 M conservan más del 70% de actividad inhibitoria residual.

Así, la estabilidad sólo se afecta de manera significativa frente a concentraciones de 1 M y 2 M.

7.1.2.10. Inmovilización de tripsina en gel de agarosa

A cada una de las muestras recolectadas en los distintos tiempos, se le midió actividad residual de tripsina (ítem 7.1.1.2.) observándose buenos valores de actividad desde el tiempo inicial $t=5$, con lo cual, la inmovilización fue casi inmediata y constante a lo largo del tiempo evaluado como puede apreciarse en la figura 9.

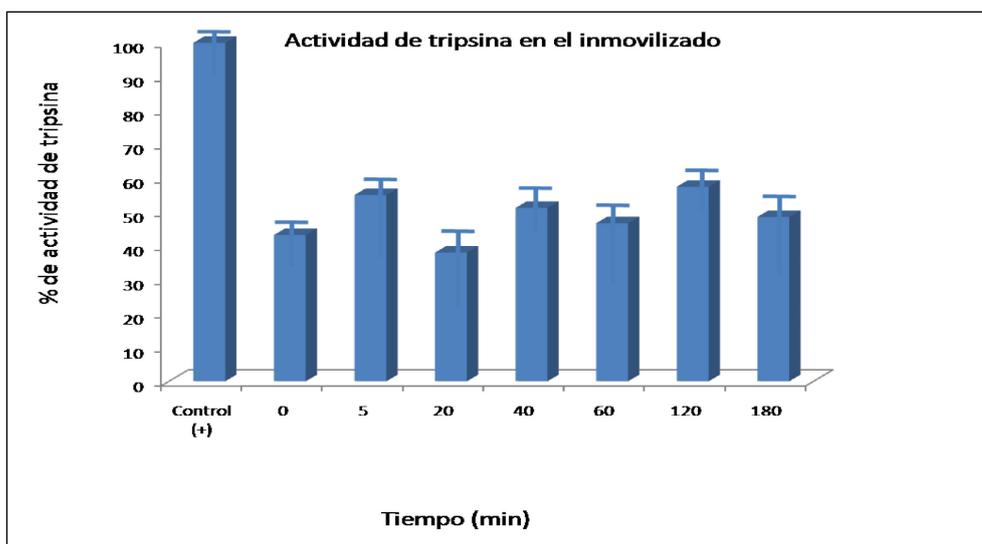


Figura 9: Actividad de tripsina en el inmovilizado. Control positivo. Tripsina más sustrato (BApNA).Tiempo 0, 5, 20, 40, 60, 80,120 y 180: Inmovilizado de tripsina más sustrato a los distintos tiempos de extracción de la muestra.

De este modo, la actividad residual de tripsina se mantuvo estable desde el inicio de inmovilización y permitió realizar con eficacia la cromatografía de afinidad.

7.1.2.11. Purificación de un inhibidor de serín proteasa usando tripsina inmovilizada

La muestra empleada para la purificación por afinidad fue el TT65, la cual fue sembrada varias veces por un sistema de recirculación de manera de aumentar el número de contactos entre la enzima y su inhibidor. De esta manera, las proteínas no retenidas al final de la columna, volvían a sembrarse al inicio de la columna mediante una tubuladura que comunicaba el final con el comienzo de la misma. El buffer de elución utilizado fue Tris-HCl 0,1 M; CaCl₂ 50 mM; pH: 7,2. Luego de varias recirculaciones se comenzó a colectar la fracción no retenida, y finalmente por cambio de buffer se realizó la elución final del pico retenido. Dicha elución se realizó con HCl 1M a pH: 3 que logró la desestabilización del complejo tripsina-inhibidor.

Se comprobó, mediante cromatografía de afinidad, la obtención de un pico retenido que presentó un porcentaje de inhibición del 84%.

7.1.2.12. SDS-PAGE del pico retenido

El pico retenido (inhibidor) proveniente de la cromatografía de afinidad, que presentó un porcentaje de inhibición del 84%, se sometió a SDS-PAGE para cuantificar su tamaño molecular y su grado de pureza.

En el gel se sembró el pico retenido, tripsina y tripsina incubada con el pico retenido. Esto último se hizo para ver si había reacción irreversible en la unión de la tripsina al inhibidor y así,

de esta manera, observar una banda del tamaño molecular igual a la sumatoria de masas de ambas proteínas. (23 kDa, tripsina, + 21 kDa inhibidor= 44 kDa). Finalmente la banda esperada no fue observada en el gel.

Debido a que las bandas no eran muy intensas, se procedió a realizar una precipitación acetónica para concentrar las muestras, y realizar un nuevo SDS-PAGE. Sin embargo con este tratamiento no pudo visualizarse la interacción tripsina-inhibidor. En la figura 9 se presentan los resultados obtenidos.

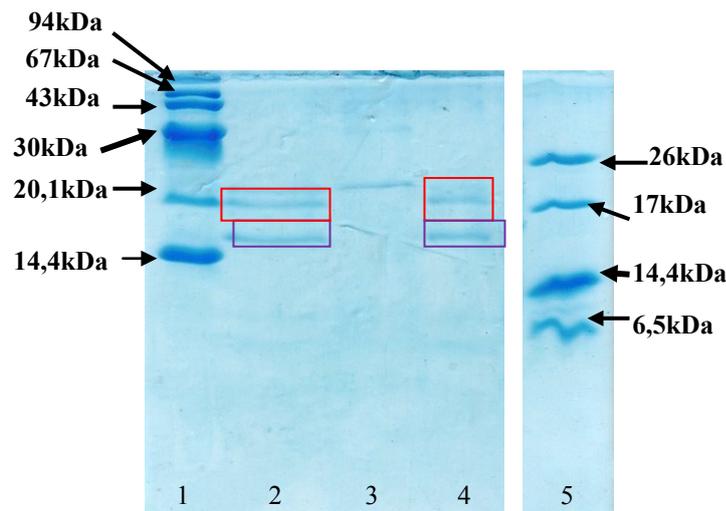


Figura 9. SDS-PAGE. Calle 1: patrón de bajo peso molecular (14kDa a 94kDa).Calle 2: pico retenido (inhibidor) más tripsina. Calle 3: tripsina. Calle 4: pico retenido solo. Calle 5: patrones multipeptidicos (6,5 kDa a 26 kDa).

En la corrida electroforética puede observarse, que tanto el inhibidor incubado con tripsina como solo, se observa una banda de alrededor de 15 kDa () y otra de aproximadamente 21 KDa (). Además en la calle 2 se presenta una banda por encima de los 21 kDa que coincide con la banda que se observa en la calle 4. No se observa ninguna banda de 44 kDa, por lo cual puede dilucidarse que la tripsina no se unió fuertemente a su inhibidor durante la preparación de la muestra para electroforesis.

Entonces, por medio de este ensayo, se observaron dos bandas (15kDa y 21kDa) que corresponderían al inhibidor. Sin embargo no se pudo lograr la verificación de la interacción tripsina-inhibidor. Únicamente el espectro de la banda de 21 kDa se identificó con un inhibidor de serín proteasa de tipo Kunitz perteneciente a la familia de inhibidores de proteasas STI (inhibidor de tripsina de soja).

7.1.2.13. Isoelectroenfoque del pico retenido

Se realizó un isoelectroenfoque (IEF) del pico retenido con el objeto de obtener estimadamente su punto isoeléctrico (pI). En la figura 10 se observa el perfil de pI del ECb de malcacha junto con el perfil del pico retenido. Observamos que la mayor parte de las proteínas del ECb enfocan a pHs neutros y ácidos. Se aprecia además que en el pico retenido hay 3 bandas que enfocan a valores de pI entre 5,5 y 7. Hay una banda principal que tiene un pI cercano a 5,8 y otras dos que tienen un pI entre 6,6 y 6,8. Existe una diferencia con el resultado del SDS-PAGE, en el cual se observan 2 bandas, mientras que, en esta corrida, aparecen 3 bandas. Esto puede deberse a efectos de carga de los grupos sulfidrilos, por lo que existe una población de las mismas proteínas en las cuales están formados los puentes y en otras no. Esto podría ocurrir con las proteínas que enfocan entre 6,6 y 6,8; por lo cual se trataría de la misma proteína. En cambio la proteína principal enfoca a pI entre 5,6 y 5,9; valor esperado para la mayoría de este tipo de inhibidores de proteasas.

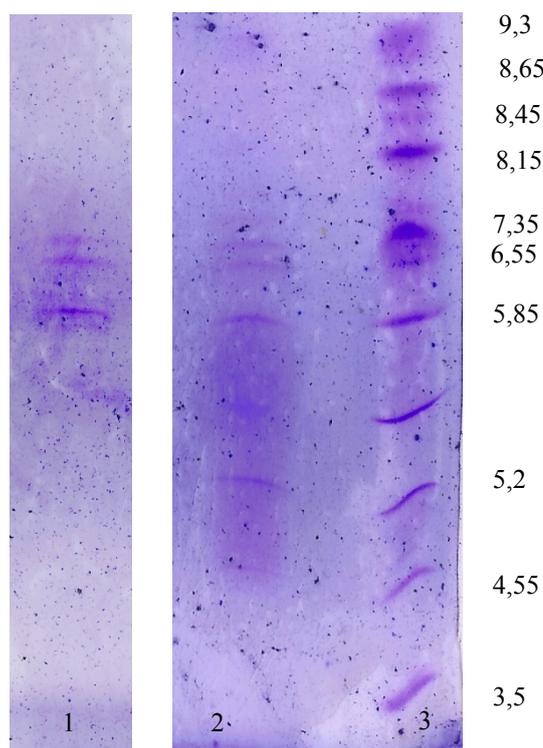


Figura 10. IEF del pico retenido de afinidad. Calle 1: Retenido de la cromatografía de afinidad. Calle 2: Extracto crudo de Malcacha. Calle 3 patrones de pI.

- Únicamente el espectro de la banda de 21 kDa se identificó con un inhibidor de serín proteasa de tipo Kunitz perteneciente a la familia de inhibidores de proteasas STI (soybean trypsin inhibitor, inhibidor de tripsina de soja).
- Por métodos bioinformáticos se pudieron comparar características del inhibidor presente en la muestra de Malcacha con un inhibidor de serín proteasas conocido y característico de la familia *solanum tuberosum*.

7.2. Especie *Arctium minus* (Fam *Asteraceae*)

Se continuó con el estudio de esta muestra cuyos objetivos fueron la evaluación de la actividad antioxidante utilizando el método de la formación del radical ABTS* [2,20-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolina-6-ácido sulfónico)]¹¹, la determinación de las masas moleculares de las fracciones de peso molecular inferiores a 3000 Da, la clonación del ADN de la proteasa de esta especie y el análisis de su secuencia.

7.2.1. Determinación de la actividad antioxidante mediante la formación del radical ABTS*

Para determinar la actividad antioxidante de las muestras a ensayar se ha seguido la técnica de Tepe *et al.*¹² con modificaciones. Dicha técnica se basa en el radical ABTS•+ que se forma tras la reacción de 7 mM de 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (ABTS) con 2,45 mM persulfato de potasio, incubados a temperatura ambiente y durante 16 horas. Una vez formado este radical, se lo diluyó en buffer fosfato 5 mM (pH 7,4) hasta alcanzar una absorbancia final de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. Se tomaron alícuotas de esta dilución de 1 ml y se mezclaron con 10 µL de las muestras de los hidrolizados a ensayar y de diferentes concentraciones del antioxidante Trolox (6-hidroxi-2, 5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) empleado como control. Luego de 10 minutos de reacción, se midió la absorbancia a 734 nm de cada una de las muestras y de los controles. El porcentaje de inhibición fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inh del ABTS}^+ = \frac{(\text{Abs B}_{0\text{min}} - \text{As M}_{10\text{min}}) - (\text{Abs B}_{0\text{min}} - \text{Abs B}_{10\text{min}})}{\text{Abs B}_{0\text{min}}} \times 100$$

¹¹ Kumaraswamy M.V. and Satish S., Antioxidant and anti-Lipoxygenase activity of *Thespesia lampas* Dalz & Gibs, *Advan. Biol. Res.*, 2008, 2(3-4), 56-59.

¹² Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H., Sokmen, A., 2005. In vitro antioxidant activities of the metanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food Chem.* 92, 89–92.

donde: Abs B_{0 min} y Abs B_{10 min} corresponden a las absorbancias de la mezcla de reacción de los blancos a los 0 minutos y a los 10 minutos de reacción; mientras que As M_{10 min} a la absorbancia de la muestra a los 10 minutos de reacción.

Los resultados se expresaron como porcentaje de la capacidad de inhibición y en mg de Trólox equivalentes por ml de muestra. Las determinaciones se hicieron por triplicado y se calculó la desviación estándar +/-.

7.2.2. Análisis de las masas moleculares

El análisis de las masas moleculares fue realizado en el Laboratorio de Proteómica e Ingeniería de Proteínas del Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona (España). En el Liprove se prepararon las muestras que fueron analizadas en el espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF de Bruker- Daltonics del citado Instituto.

La preparación de las muestras consistió en filtrar el hidrolizado proteico conteniendo los potenciales péptidos bioactivos (3–20 aminoácidos), provenientes de la reacción de hidrólisis llevada a cabo por las enzimas de las flores de *A. minus*. Dicho filtrado se realizó a través de una membrana de ultrafiltración de corte de tamaño molecular de 3 kDa para que atravesen la membrana las moléculas de tamaños menores a este valor. Para este proceso se centrifugó los tubos conteniendo la muestra durante una hora aproximadamente, siempre en condiciones de baja temperatura. El líquido que quedó contenido en la base del tubo, luego de atravesar la membrana, fue acondicionado adecuadamente para ser enviado a España para su posterior análisis espectroscópico.

7.2.3. Clonación del ADN de la proteasa de *A. minus* y el análisis de su secuencia

El ARN total se aisló a partir de 100 mg de tejido de la planta (flores inmaduras de *A. minus*) con el mini kit RNeasy Plant (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad y la cantidad relativa de ARN se estimaron mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADNc se sintetizó usando 1 g de ARN total con M-MuLV de la transcriptasa inversa (Thermo Scientific) y el cebador poli-DT17. El cDNA se utilizó como molde en la amplificación por PCR con cebadores diseñados específicamente para las secuencias conservadas 5' y 3' de los puntos de acceso. Las secuencias de los cebadores de codificación se detallan a continuación:

A) Secuencia del cebador directo: 5'-ATGGGTA ACTCAATCAAAGCA-3

B) Secuencia del cebador inverso: 5'-CAAGCTGCTTCTGCAAATCC-3'

Las reacciones de amplificación (50 µl) contienen una muestra de ADN; 5 µl buffer de PCR; 400 µM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; 0,1 unidades de Taq ADN polimerasa (Qiagen) y 1 µM de cada cebador. Los productos de PCR se visualizaron en un 1% w/v en gel de agarosa y se clonaron en pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, EE.UU.). El ADN del plásmido a partir de clones positivos se analizó por NotI / EcoRI doble digestión y se sometió a secuenciación automática del ADN. Las secuencias resultantes se analizaron con el BLAST (Local Alignment Search Tool básico), del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología y los dominios conservados se identificaron utilizando el servicio CD-Búsqueda de NCBI ¹³.

Para identificar y caracterizar adicionalmente las proteasas aspárticas de *A. minus*, se sintetizó el ADN utilizando ARN total aislado de flores jóvenes. Se lo empleó como molde para realizar la PCR con cebadores diseñados para regiones conservadas de la ORF 5' y 3' de la planta de los puntos de acceso. El producto amplificado de 1.530 pb fue clonado y varios clones fueron secuenciados. Este producto de proteína (llamada arctiumsina) codificó una preproenzima de 509 residuos con un péptido señal putativo hidrófobo de 24 aminoácidos predicha por SignalP 4,0, un pro-segmento de 44 residuos y un 441 aminoácidos-polipéptido largo interrumpido por 105 residuos correspondientes a el dominio PSI (inserto específico de plantas). La preproenzima tiene una masa molecular predicha de 55 kDa con un pI teórico de 5,3. La secuencia de aminoácidos deducida muestra la estructura primaria característica de los puntos de acceso de plantas típicas y también dos tríadas catalíticas conservadas, DTG 103-105 y 290-292 DTG correspondiente a DTG 32-34, 215-217 DTG de la numeración de la pepsina, respectivamente. Se han encontrado residuos conservados adicionales para participar en la alineación del sustrato, en su especificidad y/o la catálisis eficiente¹⁴. Estos residuos son tirosina, glicina y treonina en las posiciones 147, 148 y 149 (utilizando la numeración de YGT 75-77 pepsina). Además, dos sitios de N-glicosilación

¹³ Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Bryant, S.H. (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* 41, D348–D352.

¹⁴ Okoniewska, M., Tanaka, T., Yada, R.Y. (2000). The pepsin residue glycine-76 contributes to active-site loop flexibility and participates in catalysis. *Biochem J.* 349, 169–177.

putativo conservados en varios puntos de acceso de plantas típicas¹⁵, también se predijo en los residuos N139 y N400 (motivos Asn-X-Ser/Thr), este último en el dominio PSI.

7.2.2. Resultados

7.2.2.1. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante total *in vitro* de los hidrolizados de suero de leche después de 3 y 5 h de reacción fue calculada a partir de la decoloración de ABTS +, que se midió espectrofotométricamente.

Los hidrolizados de 3 h muestran $11,6 \pm 6,5\%$ de la actividad antioxidante con una concentración de antioxidante equivalente del control de $0,06 \pm 0,03$ mg/ml, mientras que los hidrolizados de 5 h mostraron $19,5 \pm 1,8\%$ de actividad antioxidante que corresponde a $0,10 \pm 0,01$ mg/ml de Trolox.

En vista de estos resultados, el hidrolizado de 5 h fue seleccionado para posteriores determinaciones de la actividad antioxidante.

7.2.2.2. Análisis de las masas moleculares

Los resultados pueden observarse en la figura 1, donde se muestran los perfiles de las masas moleculares de los ultrafiltrados de lactosuero hidrolizado por las enzimas de *A. minus* y sin hidrolizar. En ella, se aprecia la presencia de varios picos en el espectro correspondiente al hidrolizado del lactosuero ultrafiltrado, cuyas masas se encuentran en un rango comprendido entre 1000 y 2.500 Da (m/z). Estos picos están ausentes en el control (ultrafiltrado proveniente del lactosuero), tal como lo registra su espectro. De este modo se pudo comprobar la existencia de péptidos de bajo peso molecular provenientes de la hidrólisis enzimática del lactosuero bovino.

¹⁵ Lufrano, D., Faro, R., Castanheira, P., Parisi, G., Veríssimo, P., Vairo-Cavalli, S., Simões, I., Faro, C. (2012). Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry* 81, 7–18.

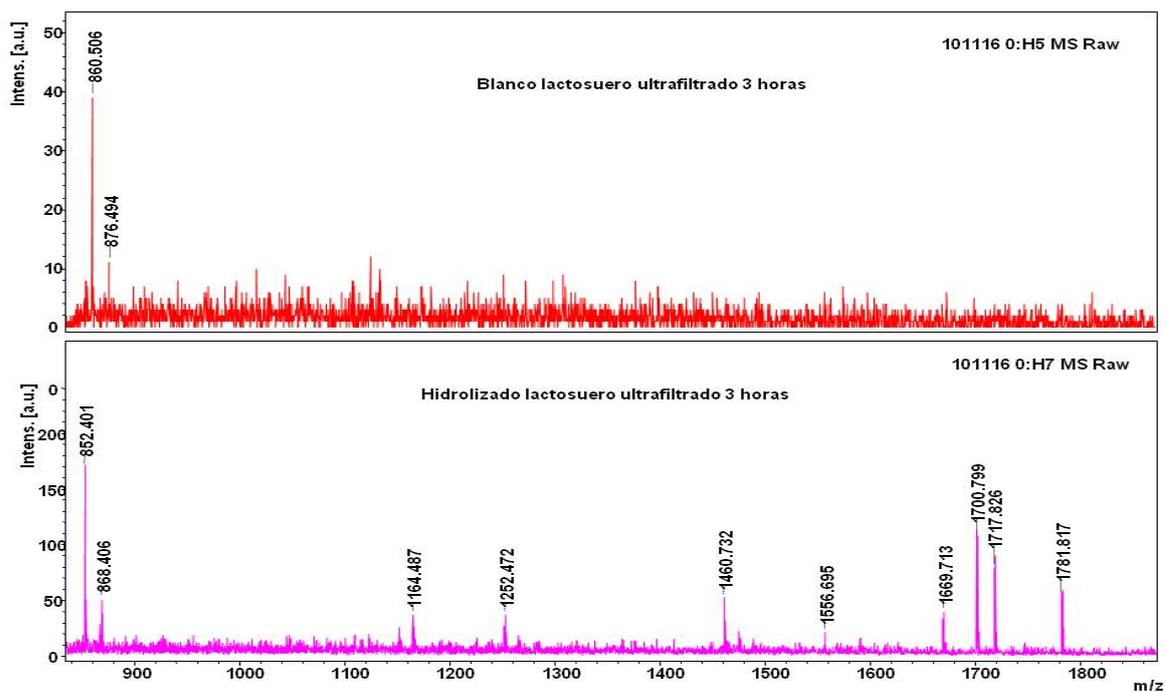


Figura 1. Espectros obtenidos del MALDI/TOF MS de las fracciones de bajo peso molecular (≤ 3 kDa) de las proteínas del suero (control) y las proteínas del lactosuero hidrolizadas durante 3 hr con las enzimas del extracto de las flores de *A. minus*

Se utilizó una herramienta de software FindPept: (<http://www.expasy.org/tools/findpept.html>) diseñada para detectar el origen de las masas peptídicas, a partir de los espectros de masa obtenidos (Fig. 1). Para esta muestra en particular, el objetivo fue identificar los posibles péptidos derivados de las proteínas del suero de leche y que podrían ser asignados a los picos del espectro con una tolerancia de masa de 0,01 Da¹⁶ (Tabla 1).

¹⁶ Gattiker, A., Bienvenut, W.V., Bairoch, A., Gasteiger, E., 2002. FindPept, a tool to identify unmatched masses in peptide mass fingerprinting protein identification. *Proteomics* 2, 1435–1444.

Secuencia analizada de la proteína del suero	Péptidos coincidentes	Δ masas (Da)	Posición en la proteína
alpha lactoalbúmina	No se encontró		
beta lactoglobulina	(L)EILLQKWENGECAQ(K)	-0.004	71-84
	(T)DYKKYLLFCMENSA(E)	0.006	114-127
seroalbúmina	(R)RPCFSALTPDETY(V)	0.009	508-520
	(L)VDEPQNLIKQNCDQ(F)	-0.008	404-417
	(K)DVCKNYQEAKDAFL(G)	-0.004	337-350
	(C)CAADDKEACFAVEGPKL(V)	0.001	582-598
lactoferrina	(N)DTVWENTNGE(S)	-0.006	565-574
	(N)IPMGLIVNQTGSCA(F)	-0.008	488-501
	(L)AENRKSSKHSSLDV(L)	0.002	431-445

Tabla 1. Identificación de posibles péptidos derivados del suero de la leche relacionados con los picos de la muestra del hidrolizado de *A.minus*. Las condiciones de análisis se basaron en una tolerancia de masa de 0,01 Da, en cisteínas tratadas con yodoacetamida y escisión inespecífica.

7.2.2.3. Clonación del ADN de la proteasa y el análisis de su secuencia

La secuencia y los dominios de la proteína, como ya ha sido mencionado, se realizaron utilizando la herramienta informática BLAST. De este modo, se confirmó la naturaleza del ADN deducido de la secuencia homóloga de los aminoácidos de las proteasas aspárticas. Cuando se compara con otros precursores de proteasas aspárticas de plantas, la secuencia de aminoácidos de arctiumsina mostró un alto grado de similitud con cirsina de *Cirsium vulgare* (identidades: 96%, Puntos positivos: 98%), cyrosina B de *C. cardunculus* (identidades: 96%, positivos: 98%), cenrosina de *Centaurea calcitrapa* (identidades: 96%, positivos: 98%), silpepsina 1 de *Silybum marianum*, identidades: 95%, aspectos positivos: 98%), la proteasa aspártica de *Helianthus annuus* (Identidades: 82%, aspectos positivos: 91%). Todas estas peptidasas pertenecen a la familia A1, MEROPS-Database peptidasa (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1. PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

-Trabajo enviado

Cecilia V. Cimino, María Laura Colombo, Constanza Liggieri, Mariela Bruno, and Sandra Vairo-Cavalli. "Partial characterisation of *Arctium minus* aspartylendopeptidase and preparation of bioactive peptides by whey protein hydrolysis". Enviado a *International Journal Food Sciences and Nutrition*.

-Asistencia técnica en el desarrollo de ensayos de laboratorio para un trabajo de investigación de la Dra. Sandra Vairo Cavalli.

Esta investigación fue publicada en la revista *Food Chemistry*, en la cual la Dra. Vairo Cavalli expresó su agradecimiento por mi colaboración en su trabajo de laboratorio. La cita bibliográfica del paper es:

Berta E. Llorente, Walter David Obregón, Francesc X. Avilés, Néstor O. Caffini, **Sandra Vairo-Cavalli**. “Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases”. (2014). *Food Chemistry* **159**:55–63.

8.1.2. COMUNICACIONES A REUNIONES CIENTÍFICAS

8.1.2.1. Bruno Mariela Anahí, Cimino Cecilia Verónica, **Liggieri Constanza Silvina**, Obregón Walter David. “Un acercamiento al Mundo de las Proteasas: Experiencias de Articulación entre nivel secundario y universidad”. Congreso en Docencia Universitaria. Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA). 17-18 de octubre de 2013. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). Argentina.

8.1.2.2. Cimino CV, **Liggieri CS**, Bruno MA, Vairo Cavalli S. Bioactive peptides derived from whey proteins with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. 37 Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas y Biología Molecular (SAIB). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 6 y 7 de noviembre de 2013. Resúmenes Técnicos Biocell. Vol. 37. Supplement, pp: 34, BT-P01.

8.1.2.3. Reyes Jara, Andrea; **Liggieri, Constanza**; Bruno, Mariela. “Utilización de harina desgrasada de soja en la preparación de hidrolizados proteicos con actividad antioxidante”. VII Jornadas Argentinas de Biología y Postcosecha. Organizado por el CIDCA-Conicet, INFIVE-Conicet y LIPA. La Plata. 28 al 30 de mayo de 2014. Libro de Acta de Resúmenes, Área Temática 3, pp: 52.

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

TAREA DOCENTE DE GRADO

CARGO: Jefe de Trabajos Prácticos

Se continuó con la modalidad implementada en el año 2012, tal como fue informado en los periodos anteriores. La *clase taller* fue la modalidad adoptada en la cátedra para que se lleven a cabo los procesos de enseñanza y aprendizaje con el objeto que los alumnos alcancen el conocimiento significativo crítico. El fundamento de esta modalidad es principalmente, la construcción de conocimiento a partir de las ideas previas que cada uno de los alumnos puede aportar a la discusión global de los contenidos curriculares. El disparador de cada clase fue un texto de trabajo o consigna sobre los contenidos correspondientes a cada clase en particular. Los docentes, a cargo de la misma, desarrollaron más profundamente los contenidos conceptuales a lo largo de las horas de discusión. 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. ACTIVIDADES DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Directora del Proyecto de Extensión: “Un acercamiento al mundo de las proteasas vegetales” (Expte: 700-13420/12-000, resolución N^{ro} 2683/12, 05/12/2012). 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 del Colegio Nacional “Rafael Hernández”, del Liceo “Víctor Mercante”, ambos de la UNLP y del Colegio Lincoln (DIPEGEP Nro 4044) ubicado 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. Año 2013.

10.2. REALIZACIÓN DE LA CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN DOCENCIA UNIVERSITARIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Acreditada con Categoría A (Resolución de CONEAU N° 262/13)

Autorizada la inscripción para la realización de la misma por la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Resolución N° 1743. Actualmente en realización.

10.2.1. Detalle de los Cursos y Seminarios cursados y aprobados hasta la fecha

- A) Seminario Intensivo: *Diseño y Coordinación de los Procesos Formativos*. Docente: Mg. Mónica Ross. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre, año 2012. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 22/09/2012.
- B) Seminario Intensivo: *Problemática de la Enseñanza en Campos. Disciplinarios Específicos - Ciencias Naturales*. Docente: Dra. Graciela Merino. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre, año 2012. Aprobado: 10 (diez). Fecha: 29/09/2012.
- C) Seminario Intensivo: *Pedagogía y Universidad*. Docente: Prof. Daniel Suarez. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre, año 2012. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 28/02/2013.
- D) Seminario intensivo: **Perspectivas sociopolíticas del sistema universitario**. Docentes: R. Marengo y C. Caminos Lagorio. Obligatorio. Primer cuatrimestre, año 2013. Aprobado: 7 (siete). Fecha: 2/08/2013.
- E) Seminario: **Desarrollo e innovación curricular**. Docentes. R. Coscarelli y G. Hernando. Obligatorio. Primer Cuatrimestre, año 2013. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 9/08/2013.
- F) Seminario Intensivo: Procesos de Evaluación en la Educación Superior. Docente: Sonia Araujo. Electivo. Primer Cuatrimestre año 2013. Aprobado: 10 (diez). Fecha: 23/08/2013.
- G) Seminario: **Taller de Producción del Trabajo Final de la Especialización**. Docentes: Santos y Catino. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre año 2013. Aprobado: 8 (ocho). 10/11/2013.
- H) Seminario: **Prácticas de Intervención académica**. Docente: Mónica Paso. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre año 2013. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 03/02/2014.

10.2.2. Detalle de los Seminarios cursados y/o en proceso de cursada hasta la fecha

Seminario: **“Taller de Escritura de Textos Académicos”**. Docente: Guillermina Piatti. Optativo. Primer cuatrimestre año 2014.

10.3. CURSO DE CAPACITACIÓN CIENTÍFICO-ACADÉMICA

2014 (23 al 27 de Junio). **Hidrología de humedales y su relación con las aguas subterráneas.**

Dictado por la Dra. Eleonora Carol. Organizado por el Departamento de Postgrado de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (U.N.L.P.). Duración: 40 hs. Con Evaluación Final Aprobada.

10.4. PARTICIPACIÓN COMO CO-DIRECTORA EN PROYECTOS ACREDITADOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

El Proyecto titulado “Obtención de compuestos bioactivos naturales, sintéticos y recombinantes mediante el uso de hidrolasas de plantas autóctonas. Evaluación de las propiedades biológicas” (Código X-576), desde su comienzo, se encontraba bajo la dirección de la Dra. Nora Priolo. Sin embargo en la actualidad, debido a la baja de la misma por motivos personales, fueron designadas como Directora y Codirectora del mismo a partir del 01/05/2013, las Dras. Bruno Mariela y Liggieri, Constanza, respectivamente.

10.5. REFERATO DE TRABAJOS CIENTIFICOS

Referato del manuscrito AJBR-22.06.14-0788 (2014). *African Journal of Biotechnology Research (AJBR)*. ISSN: 1684-5315.

10.6. GESTIÓN ADMINISTRATIVA Y CONTABLE DE LABORATORIO

Responsable de la gestión administrativa y contable del Liprove (Laboratorio de Investigación de proteínas vegetales), incluyendo la confección y traslado de los formularios de orden de provisión de fondos a la administradora de los PICTs otorgados para el Laboratorio, rendición de subsidios, de servicios a terceros, manejo de fondos y realización de operaciones bancarias asistida por el Director del Laboratorio, entre otras. Actividad desarrollada desde marzo de 2006 y actualmente en ejecución.