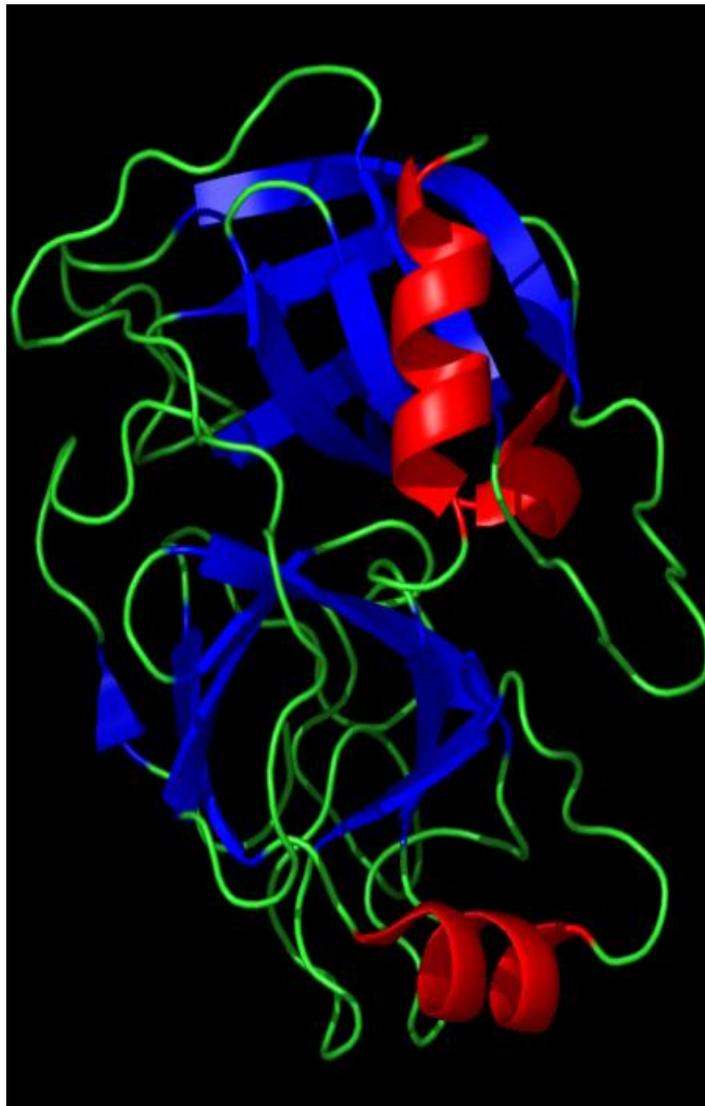


2012

Laboratorio de Enzimas
Hidrolíticas - Facultad de
Ciencias (UdelaR)

Laura Macció



BÚSQUEDA Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE TRIPSINA EN EXTRACTOS DE Schinus molle.

Tesina de Grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas

TUTORA: Dra. Ana María Cantera CO- TUTOR: Lic. Diego Vallés

DEDICATORIA

Desde pequeña he perseguido un sueño, hoy pareciera que parte del sueño se comienza a hacer realidad como dijera aquel iluminado personaje bajo el *Ficus religiosa*: "Si quieres conocer el pasado, entonces mira tú presente que es el resultado. Si quieres conocer tu futuro mira tú presente que es la causa". Desde el comienzo hasta hoy día, jamás estuve sola en el recorrido, sino que lo hemos hecho juntos, por lo cual solo resta compartirlo y agradecer.

A Dios; porque si bien yo te he dado la espalda en algún momento siempre estuviste a mi lado, iluminando mí vida. Y me diste el mejor de los obsequios, el de ser soñadora, el de vivir.

Al apoyo, esfuerzo y entusiasmo de mis Padres y Abuela que me han siempre hecho llegar en cada nuevo emprendimiento, haciéndome saber que la educación y cariño son las herramientas que ellos podrían legarme para afrontar, descubrir y disfrutar el mundo a lo largo de mi vida. Dicen que uno aprende a ser Padre cuando es Abuelo e Hijo cuando es Padre, bueno, creo que en equipo, nosotros vamos aprendiendo a ser Familia.

Madrina y Padrino que han sabido acompañarme y estar siempre conmigo en todo momento de la vida.

Especialmente a la Dra. Ana María Cantero y los Lic. Carolina Villadóniga y Diego Vallés quienes no solo han sabido guiarme en el desarrollo académico y transmitirme las bases necesarias para iniciarme en el camino científico, sino también hacerme llegar valores y formas de trabajo que no solo son necesarias para crecer profesionalmente sino también como persona, por lo cual han sabido ser Mis Grandes Educadores en estos años de estudio.

Agradecer a los amigos de hierro; que han estado en las buenas, en los tropezones y en los más duros golpes. A los que han elegido ser amigos míos a pesar de mis muchos defectos. Esa Familia adoptiva que me regaló la vida: "hermana, hermanita, mamá, melli, mis niños", en definitiva Amigos con los que hemos hechos mil y una locura, recorrido aventuras, sobrepasado días difíciles, con quiénes nos hemos dado esos inolvidables abrazos.

A los conocidos, compañeros y ex compañeros de estudios y trabajo, y personas con las que quizás haya compartido poco tiempo, pero me han brindado esas palabras u gestos precisos, en los momentos justos.

Porque el hecho de llegar o no a la meta no es lo importante, lo importante es el camino recorrido y el hecho de que de algún modo, perseguir este sueño me ha llevado a conocerlos a cada uno de Ustedes y a aprender de ustedes lo único valioso que me voy a llevar de la vida.

Agradecer a la Facultad de Ciencias (UdelaR) y ANII ya que el Trabajo fue realizado en el marco de la Beca de Iniciación BE_INI_2010_2060.

Los que nos educan son aquellas personas a las que le damos lugar en nuestras vidas: **"Aceptar es parte del crecer entender es un trozo de envejecer"**

INDICE ANALÍTICO

MARCO TEÓRICO	7
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Generalidades de Proteasas.....	7
1.2. Proteasas Serínicas	8
1.3. Tripsina.....	9
1.4. Generalidades de Inhibidores	13
1.5. Inhibidores de Proteasas	16
1.6. Inhibidores de Proteasas de Plantas.....	17
1.7. Inhibidores de Proteasas Serínicas	18
1.8. Aplicaciones Industriales de Inhibidores de Proteasas Serínicas de plantas.....	18
1.9. Generalidades de <i>Schinus molle</i> (anacahuita)	19
DESARROLLO EXPERIMENTAL	20
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Generales	20
2.2. Objetivos Específicos	20
MATERIALES & MÉTODOS.....	21
3. MATERIALES	21
3.1. Vegetales	21
3.2. Reactivos	21
3.4. Equipos	21
4. MÉTODOS	22
4.1. Preparación de extractos	22
4.1.1. Extractos AcuosoS	22
4.1.2. Extractos Etanólicos	23
4.2. Determinación de Actividad Proteolítica	24
4.2.1. Método de Azocaseína	24
4.2.2. Método de BAEE	25
4.3. Determinación de los Parámetros de Actividad de Tripsina con a- zocaseína	26

4.3.1. Determinación de límites de la actividad de preparado enzimático a emplear según ensayo 4.2.1	26
4.3.2. Estudio de la actividad en el tiempo de reacción	26
4.3.3. Estudio de la actividad de la tripsina Vs concentración de sustrato	26
4.4. Inhibición de tripsina con inhibidor serínico comercial (PMSF) ...	27
4.5.1. Tiempos de inhibición enzimática	27
4.5. Búsqueda de actividad proteolítica en extractos vegetales	27
4.6. Búsqueda de actividad inhibitoria en extractos de <i>S. molle</i>	27
4.7. Determinación de parámetros de inhibición de tripsina con extractos de <i>S. molle</i> de mayor actividad inhibitoria	28
4.7.1. Tiempos de inhibición enzimática	28
4.7.2. Determinación del tipo de inhibición Diagrama LB	28
4.7.3. Tratamiento de Datos	29
4.7.4. Determinación de IC ₅₀ por Método 4.2.1	29
4.7.5. Determinación del IC ₅₀ por Método 4.2.2	29
4.7.6. Tratamientos de Datos	30
4.8. Evaluación del extracto acuoso de hoja extraído a 100°C en 5 minutos de agitación	30
4.8.1. Estudio de pH óptimo de inhibición	30
4.8.2. Fraccionamiento por tamaño molecular	30
 RESULTADOS & DISCUSIÓN	 31
5.1. Preparación de Extractos.....	31
5.2. Determinación de los parámetros de actividad de tripsina con azocaseína	32
5.2.1. Dilución del preparado enzimático a emplear según los límites de detección del ensayo	32
5.2.2. Estudio de la V ₀ en las condiciones de actividad seleccionada	33
5.2.3. Efecto de la concentración de sustrato en la V ₀	34
5.3. Inhibición de tripsina con PMSF	35
5.3.1. Evaluación de %AR en función del tiempo de inhibición	35
5.3.2. V ₀ en función de la concentración de inhibidor.....	36
5.4. Búsqueda de actividad inhibitoria de tripsina en extractos vegetales	38
5.5. Evaluación de la inhibición de tripsina de los extractos de 2 y 6 <i>S. molle</i>	40
5.5.1. Evaluación de %AR en función del tiempo de inhibición	40
5.5.2. Parámetros de la actividad de tripsina usando BAEE como sustrato	41
5.5.3. Tipificación de la inhibición	42

5.5.4. Determinación de IC ₅₀	44
5.6. Evaluación del extractos 6	48
5.6.1. Determinación de pH óptimo de la inhibición	48
5.6.2. Búsqueda de actividad inhibitoria de tripsina en fracciones de distinto tamaño molecular de extracto de <i>S. molle</i>	49
BIBLIOGRAFÍA	52

Marco Teórico

1. Introducción

1.1. Generalidades de proteasas

Las proteasas como son hidrolasas que catalizan procesos de hidrólisis de enlaces peptídicos de proteínas, mediante la participación de una molécula de agua, para formar péptidos de menor tamaño y/o aminoácidos libres (Figura 1). Se encuentran ampliamente distribuidas en casi todas las plantas, animales y microorganismos, siendo que en organismos superiores alrededor del 2 % del genoma, codifica para estas enzimas (Habib, 2007; Ivanov, 2006 Joanitti, 2006).

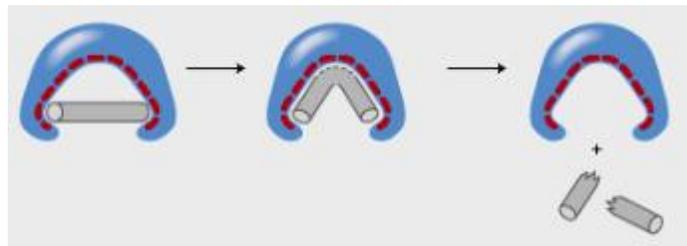


Figura 1- Fragmentación de proteínas en unidades de menor tamaño catalizada por proteasas.

Estas enzimas están implicadas en una multitud de reacciones fisiológicas, desde la absorción de aminoácidos de la dieta y eliminación de proteínas no deseadas, hasta acontecimientos de proteólisis catalizada en cascadas altamente reguladas. Por ejemplo, la participación como mediadores de la iniciación, transmisión y terminación de muchos de los eventos celulares, tales como la inflamación (sistema del complemento), vías de apoptosis y coagulación sanguínea (Ivanov, 2006). A pesar de que estas enzimas son indispensables en la célula y los organismos en los que residen,

pueden ser potencialmente perjudiciales cuando se sobreexpresan o están presentes en altas concentraciones. Por esta razón, estas enzimas deben estar estrictamente reguladas y controladas (Rawlings, 2004).

En 1992 el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC- IUBMB) reconoció cuatro clases de proteasas: aspárticas, serínicas, metaloproteasas y cisteínicas, según posean un residuo de aspartato, serina, grupo metálico o cisteínas en su sitio activo, respectivamente (Fan, 2005). Se subdividen en exopeptidasas que actúan sobre aminoácidos ubicados en el N o C- terminal, y endopeptidasas, que rompen enlaces peptídicos internos de los polipéptidos (De León, 2002).

1.2. Proteasas Serínicas

Las proteasas serínicas son la clase más estudiada de proteasas. Estas se agrupan en clanes que comparten similitudes estructurales. Los clanes más importantes son: el clan de quimotripsina y el de subtilisina. El clan quimotripsina incluye enzimas de mamíferos, de las cuales, las tres que han sido estudiadas con mayor detalle son: quimotripsina, tripsina y elastasa (Fun, 2005). Estas tres proteasas son el resultado de evolución divergente y difieren en su especificidad.

Las proteasas tipo serínicas reciben este nombre ya que poseen un residuo de serina reactivo, **Ser-195**, que ataca el carbonilo del sustrato formando un intermedio acil-enzima (catálisis covalente nucleofílica) entre el grupo acilo del sustrato y la serina de la enzima. La reactividad de la serina es dependiente de su disposición con respecto a otros dos residuos, el **Asp-102** y la **His-57**, estos tres residuos se conocen como la tríada catalítica. La His-57 y el Asp-102 se encuentran en el dominio 1, y mientras que la Ser-195 en el dominio 2. En los diagramas estos aminoácidos se indican en color rojo (Figura 2) (Muller- Esterl, 2008).

La his-57 polarizada por Asp-102 actúa como base y acepta un protón de la serina, la forma desprotonada de la Ser-195 es un nucleófilo más fuerte que la protonada (Muller-Esterl, 2008).

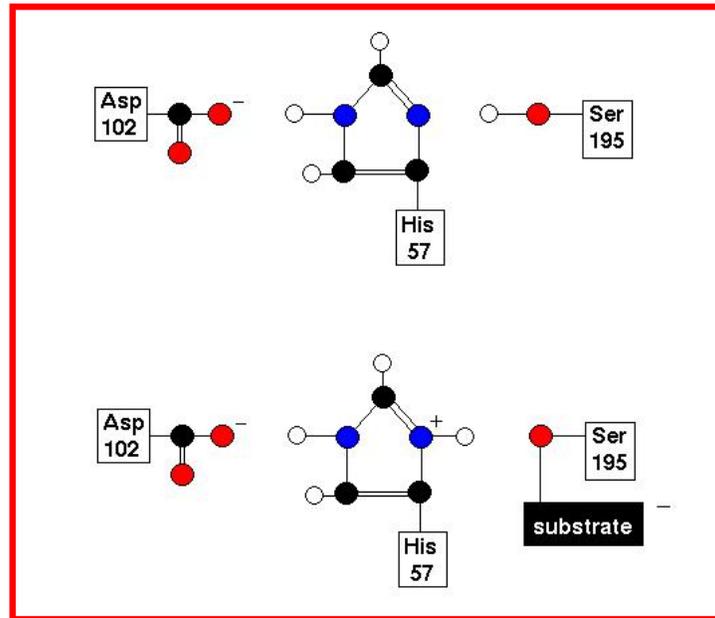


Figura 2- Triada catalítica de las proteasas tipo serina.

1.3. Tripsina

La tripsina (E.C. 3.4.21.4) es utilizada como modelo dentro de las proteasas serínicas. Es una endopeptidasa que presenta alta especificidad hidrolizando enlaces peptídicos cuyo carboxilo corresponden a una arginina o lisina, excepto cuando el siguiente residuo es una prolina (Marques, 2011; Muller-Esterl, 2008). Es producida en el páncreas donde se dispone en vesículas secretoras en su forma proenzima inactiva, tripsinogeno (Uesugi, 2011).

Las vesículas que contienen tripsinogeno migran hacia las microvellosidades y una vez allí, donde células de la mucosa intestinal segregan la enzima enteroquinasa, se escinde un hexapéptido del tripsinogeno para formar tripsina activa cuando el pH se encuentra entre 5.2 y 6.0. Una vez formada, la tripsina puede también realizar una división hexapéptica del tripsinogeno, proporcionando más tripsina. De esta forma, la tripsina convierte otras formas inactivas de enzimas pancreáticas en sus formas activas (García, 2007; Terra, 2005).

Las secuencias completas de tripsinas de distintos orígenes se caracterizan por tener un péptido señal de activación, seguido de la secuencia correspondiente a la forma activa de la tripsina, ésta incluye un N- terminal conservado, formado por los residuos IVGG. También están conservados los aminoácidos de la triada catalítica, así como tres pares de residuos de cisteína que forman puentes disulfuro y el residuo de Asp 189, que es determinante para la especificidad (Figura 3) (Barrett, 1998; Díaz, 2006; Terra, 2005).

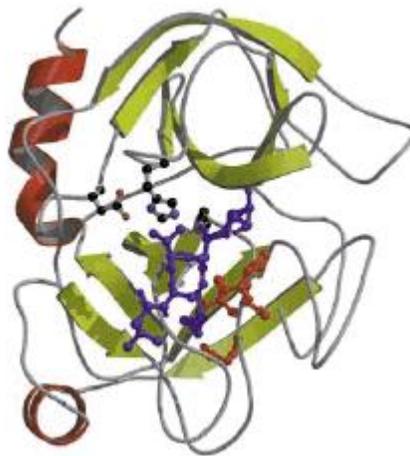


Figura 3- Representación de la estructura de la Tripsina (Robert Stroud/ Universidad de California, San Francisco).

La tripsina en mamíferos presenta un peso molecular de alrededor de 24 kDa (Ásgeirsson, 1989; Díaz, 2006). La forma activa consta de una cadena polipeptídica de 224 aminoácidos de longitud que adopta la forma de una molécula globular con dos dominios ricos en lámina plegada β . En el punto de contacto de ambos dominios, la superficie de la tripsina presenta un bolsillo que alberga el lugar de unión del sustrato (Figura 4). El centro activo tiene dos funciones: la unión del sustrato y la catálisis de la rotura. Como se observa en el modelo de cintas, ambos dominios son necesarios para formar la triada catalítica (Muller- Esterl, 2008).

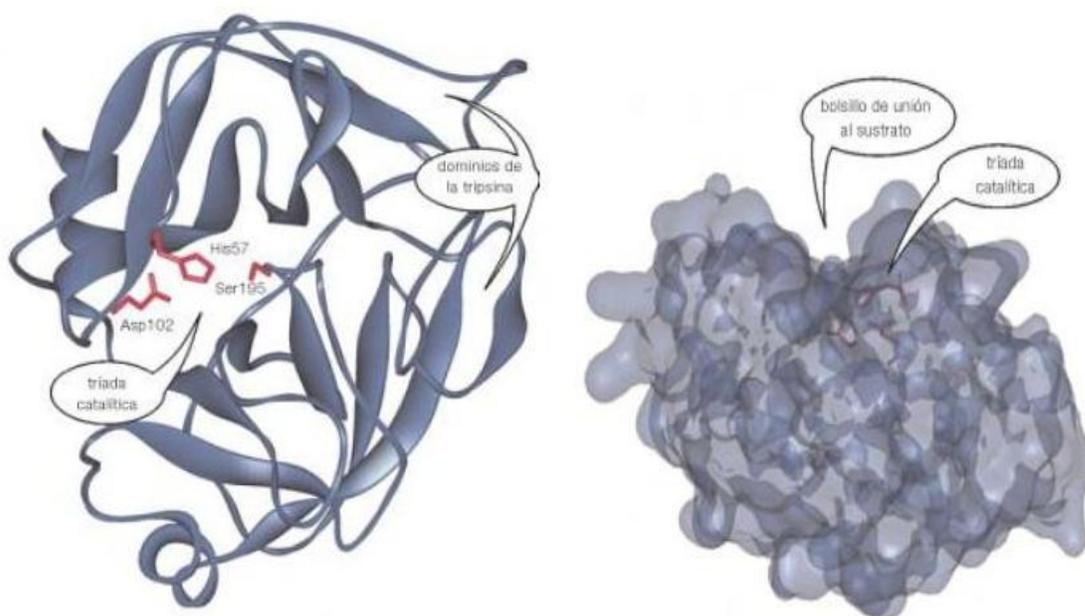


Figura 4- Modelo de cintas de la estructura espacial de la tripsina. Representación llenado espacial del contorno.

El residuo de aspartato (Asp 189) localizado en el dominio catalítico 1 de la tripsina tiene la función de atraer y estabilizar lisinas y argininas (ambas cargadas positivamente) y por ello es responsable de la especificidad de la enzima (Figura 5). (Marques, 2011; Muller- Esterl, 2008). Así queda establecida la preferencia por sustratos, la cadena lateral del sustrato cargada negativamente puede formar un

puente salino en el bolsillo catalítico, las cadenas laterales negativas son repelidas; las no cargadas y polares no se pueden unir fuertemente (Muller- Esterl, 2008).

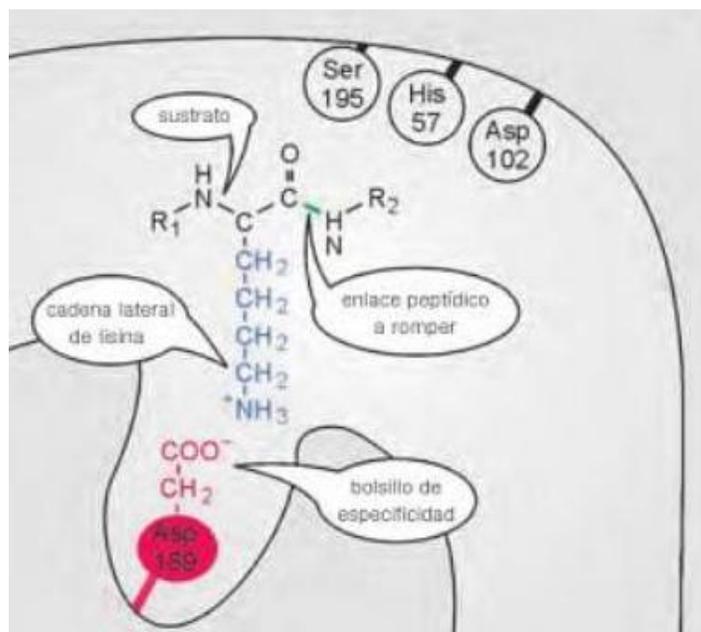


Figura 5- Especificidad de la tripsina.

1.4. Generalidades de Inhibidores

La actividad de una enzima puede ser disminuida o eliminada completamente por la acción de ciertas sustancias a las cuales se las conoce con el nombre genérico de inhibidores enzimáticos. No deben ser incluidos en este grupo aquellos agentes que producen simplemente la destrucción de la enzima.

Los inhibidores se pueden clasificar en dos grandes grupos: **Irreversibles** y **Reversibles**. En el primer caso la enzima no recobra su actividad por remoción del inhibidor libre. Esto es debido a que el inhibidor se une covalentemente o tan fuertemente que su disociación es despreciable. Así las sustancias tóxicas a menudo son inhibidores irreversibles de enzimas clave en el metabolismo. En el segundo caso, la enzima recobra su actividad por remoción del inhibidor libre (por ejemplo por simple diálisis). Lo cual demuestra que hay un equilibrio entre el inhibidor libre y la enzima.

En la inhibición reversible, el inhibidor también interactúa con algún grupo esencial de la enzima pero en forma reversible. Existen distintas formas de interacciones que se traducen en varios tipos de inhibición perfectamente diferenciables experimentalmente. Se pueden clasificar como inhibidor: competitivo, acompetitivo, mixto y no competitivo, según el efecto que produzcan en las constantes K_m y V_{max} . Este efecto dependerá de que el inhibidor se una a la enzima libre, al complejo enzima- sustrato o ambos (Leatherbarrow, 1990).

En la **inhibición competitiva** el inhibidor se combina reversiblemente con la enzima libre en el sitio activo por el cual se debería de unir el sustrato, impidiendo por lo tanto la formación del complejo activo enzima- sustrato. De ahí el nombre de competitiva, porque efectivamente tanto el inhibidor como el sustrato compiten por el mismo sitio tratando de desplazarse mutuamente. Por ello este tipo de inhibición se caracteriza en que puede disminuir considerablemente aumentando la concentración de sustrato. La

inhibición competitiva aumenta el valor de K_m , pero no afecta la $V_{m\acute{a}x}$ (Leatherbarrow, 1990; Lineweaver, 1934; Peretó, 2007) (Figura 6).

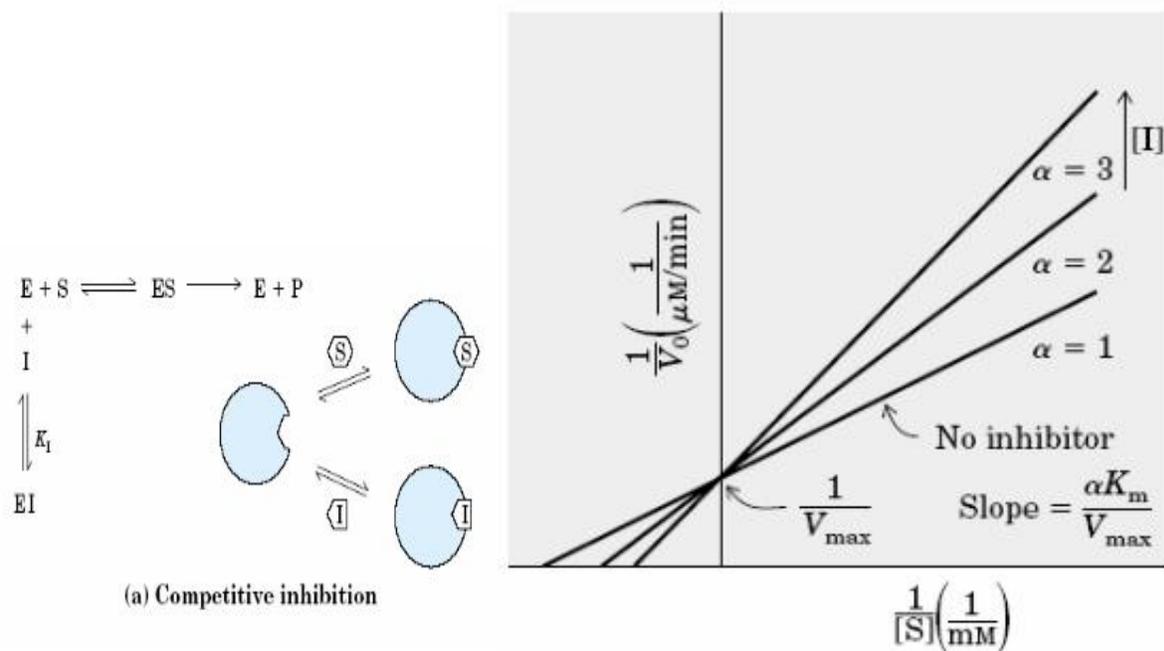


Figura 6- Formación de complejo y Diagrama de Lineweaver- Burke Inhibición competitiva.

Los **inhibidores acompetitivos** se unen al complejo enzima- sustrato interfiriendo con la formación de producto, pero no a la enzima libre. Son poco frecuentes para enzimas que presentan un único sustrato, pero se observan en sistemas multisustrato. Los inhibidores acompetitivos modifican tanto K_m como $V_{m\acute{a}x}$ (Figura 7) (Leatherbarrow, 1990; Lineweaver, 1934; Peretó, 2007).

Los **inhibidores mixtos** se unen tanto a la enzima libre como al complejo enzima- sustrato, por lo tanto interfieren con la unión del sustrato y la formación del producto.

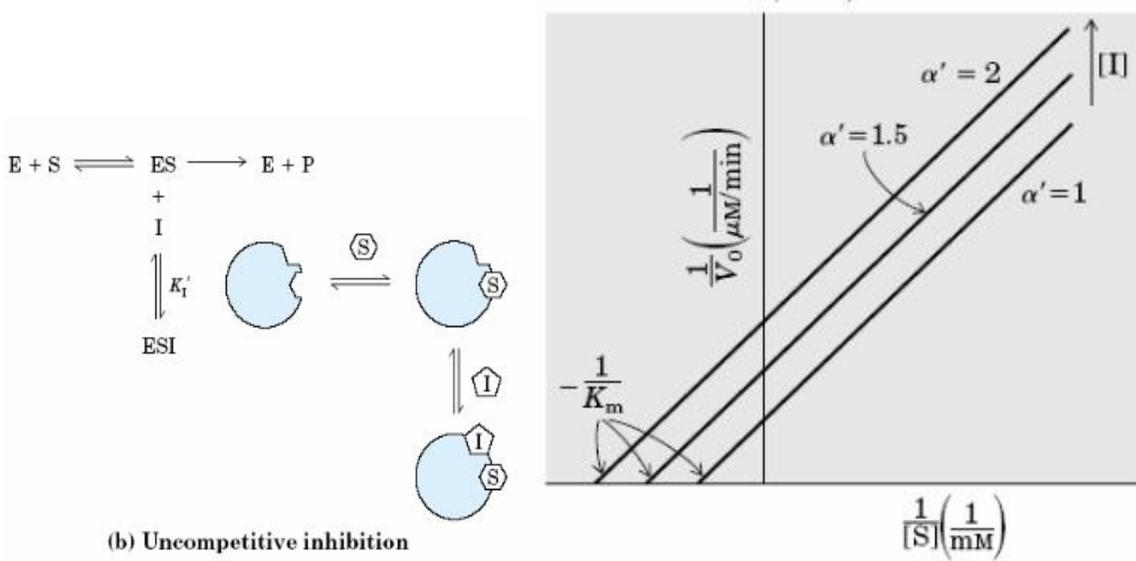


Figura 7- Formación de complejo y Diagrama de Lineweaver- Burke Inhibición acompetitivo.

Los inhibidores de tipo mixto incrementan la K_m y dificultan la catálisis por lo que disminuyen la V_{max} (Figura 8) (Leatherbarrow, 1990; Lineweaver, 1934; Peretó, 2007).

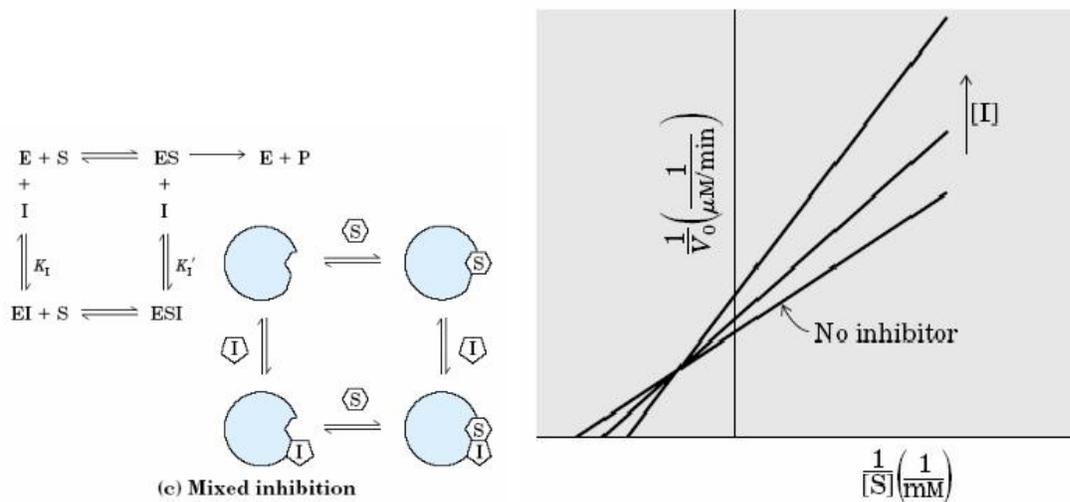


Figura 8- Formación de complejo y Diagrama de Lineweaver- Burke Inhibición mixta.

Los **inhibidores no competitivos**, son un tipo especial de inhibidores mixtos que se unen con igual afinidad a la enzima libre y al complejo enzima- sustrato. En la inhibición no competitiva, se postula que el inhibidor se une con la enzima en otro sitio, que no es aquel por el cual se une el sustrato. Por esa razón la unión del sustrato con la enzima no es afectada por la presencia del inhibidor y se puede formar entonces un complejo enzima-sustrato-inhibidor. Pero este complejo es catalíticamente inactivo y no puede escindirse en productos de la reacción y complejo enzima-inhibidor. Este tipo de inhibición se caracteriza entonces porque no puede ser revertido por un aumento de la concentración de sustrato. El sustrato no puede desplazar al inhibidor unido a la enzima. Como resultado, el grado de inhibición depende solamente de la concentración del inhibidor. La inhibición no competitiva no modifica la K_m pero disminuye la $V_{m\acute{a}x}$ (Leatherbarrow, 1990; Lineweaver, 1934; Peretó, 2007).

1.5. Inhibidores de Proteasas

El estudio científico de los inhibidores de la proteasas es casi tan antiguo como el de las propias proteasas. Las células no podrían sobrevivir mucho tiempo si estas poderosas enzimas no estuvieran reguladas. Aunque Northrop y Kunitz identificaron los primeros inhibidores naturales de proteasa como parte de sus estudios de proteasas en la década de 1930, no se comenzó a diseñar inhibidores de proteasa en el laboratorio hasta aproximadamente una década más tarde, e incluso entonces los avances fueron irregulares. Desde entonces cientos de inhibidores de proteasas son ahora conocidos y objeto de miles de comunicaciones de investigación. El interés en la comprensión de la importancia fisiológica de los inhibidores de proteasas se ha incrementado debido a su capacidad de regular distintos procesos en los que las proteasas actúan. Son importantes herramientas para lograr un mejor entendimiento del metabolismo de las proteínas y se pueden utilizar para diseñar nuevas sustancias para el control de enfermedades y procesos patológicos (Lingaraju, 2008).

En general los inhibidores de proteasas son pequeños y bastante comunes en la naturaleza, estando presente en todas las formas de vida. La mayoría de los inhibidores actúan con su proteasa objetivo a través del sitio activo, lo que resulta en la formación de un complejo proteasa- inhibidor, que es incapaz de presentar actividad enzimática. Los inhibidores naturales de proteasas tienen una enorme diversidad de función, siendo esenciales para la regulación de la actividad de sus correspondientes proteasas en las vías metabólicas en que participan (Birk, 2003).

1.6 Inhibidores de Proteasas en Plantas

Algunos insectos y muchos de los microorganismos fitopatógenos secretan enzimas extracelulares y, en particular, las enzimas que causan una digestión proteolítica que desempeñan un papel importante en la patogénesis. Las plantas, sin embargo, también han desarrollado mecanismos para luchar contra estos organismos invasores. Una importante línea de defensa que las plantas tienen para luchar contra estos patógenos es a través de diversos inhibidores que actúan disminuyendo la actividad proteolítica. Estos inhibidores están distribuidos en todo el reino vegetal y se han descrito en muchas especies de plantas (Habib, 2007). Suelen ser pequeñas proteínas que generalmente se presentan en altas concentraciones en los tejidos de plantas, llegando a contribuir hasta el 10% del contenido total de proteínas en estas. Se los ha detectado en hojas y principalmente en semillas (Ryan, 1990). Se ha reportado que inhibe el crecimiento y el desarrollo de los animales que se alimentan de estas plantas. Algunos de los efectos observados en los animales son la disminución de la adsorción de nitrógeno y un aumento en el tamaño del páncreas (Liener, 1980). Los inhibidores de proteasas de plantas se han descrito como reguladores endógenos de la actividad proteolítica (Chaudhary, 2008; Franco, 2003).

1.7. Inhibidores de Proteasas Serínicas

Los inhibidores de proteasas se han agrupado en familias y subfamilias diferentes, en base a la secuencia, pliegues, dominios o unidades de la proteína inhibidora. Las plantas contienen una variedad de inhibidores de proteasas serínicas que han sido aislados de distintos tejidos y órganos vegetales. Las familias que han presentado actividad inhibitoria frente proteasas serínicas en plantas han sido: Serpin, Bowman Birk, Kunitz, Squash, Mustard y Cereal (Habib, 2007).

Dentro de este grupo de inhibidores ampliamente estudiado, se ha puesto énfasis en los inhibidores de tripsina, si bien hasta el momento, sólo se conocen muy pocas fuentes naturales de inhibidores de la tripsina (Fei Fang, 2010).

1.8. Aplicaciones Industriales de Inhibidores de Proteasas Serínicas de Plantas

En 1991, los inhibidores de proteasas de plantas ya habían aparecido para uso terapéutico y aplicaciones de laboratorio. Los estudios epidemiológicos de la reducida incidencia de cáncer de mama, colon y próstata en poblaciones vegetarianas sugirieron un papel importante de estos inhibidores vegetales en la prevención de estos tipos de cáncer. Se ha demostrado la regulación de procesos fisiológicos humanos con inhibidores de proteasa de plantas, por ejemplo, señalización celular, digestión, fertilización, crecimiento, diferenciación, defensa inmunológica, cicatrización de heridas y apoptosis, por lo cual presentan un gran potencial terapéutico (Billings, 1992; Fan, 2005; Fei Fang, 2010).

Por lo cual es de vital importancia explorar nuevas fuentes naturales que muestren capacidad inhibitoria procurando aumentar el valor agregado de nuestra flora autóctona.

1.9. Generalidades de *Schinus molle* (Anacahuita)

Schinus molle vulgarmente conocido como anacahuita, es una especie nativa de Sudamérica (Heywood, 1993) perteneciente a la Familia Anacardiaceae (Cabrera, 1965). Su rango de distribución de América del Sur abarca: Ecuador, Paraguay, Perú, sur de Brasil, Chile, Argentina y Uruguay (Tortorelli, 1956).

Se trata de un árbol pequeño que crece entre 4 y 8 m de altura con un tronco de 25-35 cm de diámetro. Tiene hojas largas perennes, pinadas y discretas, flores de color blanco verdoso. Es una planta polígama dioica, es decir que algunas de sus flores son hermafroditas en tanto que otras son masculinas. Las hermafroditas y las masculinas están separadas en distintos pies (o sea, en distintos árboles). Las flores masculinas no pueden dar frutos, mientras que las hermafroditas sí, originan drupas del tamaño de un grano de pimienta, de color rosa brillante, con muy poca carne (de Wit, 1993; Wano, 2008) (Figura 9).



Figura 9- Imágenes del árbol *Schinus molle*, sus hojas, flores y drupas.

Desarrollo Experimental

2. Objetivos

2.1. Objetivo General:

- 📌 Búsqueda y evaluación de la capacidad inhibitoria de tripsina en extractos de drupas y hojas de *Schinus molle*.

2.2. Objetivos Específicos:

- 📌 Obtención de extractos de *S. molle* en distintas condiciones
- 📌 Búsqueda de actividad proteolítica en los extractos de *S. molle*
- 📌 Búsqueda de actividad inhibitoria de tripsina en los extractos de *S. molle*
- 📌 Evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos seleccionados:
 - Determinación de capacidad inhibitoria 50% (IC₅₀)
 - Determinación de pH óptimo
 - Determinación del tipo de inhibición

Materiales & Métodos

3. Materiales:

3.1. Vegetales:

El material vegetal de *Schinus molle* fue colectado de la ciudad de Pando, Canelones (Uruguay). Las hojas verdes fueron colectadas mensualmente durante el período de un año y drupas secas fueron colectadas en el mes de Diciembre.

3.2. Reactivos:

Azocaseína SIGMA- A 2765; Na- Benzoyl- L- Arginine Ethyl Ester (BAEE); Tripsina Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) (SIGMA)

Fosfato de sodio mono y disódico; etanol; HCl; hipoclorito de sodio; metanol; NaOH; ácido tricloroacético (TCA) (Calidad PPA)

3.3. Equipos

Agitador Magnético, Baño de agua termostatizado, Centrifuga Refrigerada Sigma 3 K 18, rotor 19776- H, Centrifuga Sigma 2-15, rotor nº 12145, Espectrofotometro UV-visible Shimadzu UV- 1603.

4. Métodos:

4.1. Preparación de extractos

Fueron preparados extractos vegetales a partir de hojas frescas y drupas de *S. molle* (Figura 10). El material vegetal fue desinfectado durante 30 minutos con hipoclorito de sodio (0.5% v/v), enjuagado repetidas veces con agua destilada y secado en corriente de aire sobre papel de filtro.



Figura 10- Hoja fresca (izquierda) y drupas secas (derecha) de *S. molle*.

4.1.1. Extractos acuosos

A. Fueron pesados 2.0 g de hojas y drupas por separado, fueron agregados 10 mL de agua destilada, machacado en mortero y colocado en agitador magnético durante 5 minutos a la temperatura correspondiente. El preparado fue filtrado a vacío por vidrio sinterizado y el filtrado obtenido fue centrifugado durante 10 minutos a 6654 xg a 4°C. Se trabajo con agua destilada en dos condiciones de temperaturas distintas: 25 y 100°C.

B. Fueron pesados 2.0 g de hojas, fueron agregados 10 mL de agua destilada a 25°C, machacado en mortero y colocado en agitador magnético durante 24 y 48 horas a la temperatura ambiente. El preparado fue filtrado a vacío por vidrio sinterizado y el filtrado obtenido fue centrifugado durante 10 minutos a 6654 g a 4°C.

C. Fueron preparados extractos seriados a partir de hoja de anacahuita, pesando 8.0 g de material vegetal, fue agregado 40 mL de agua destilada, machacado en mortero y colocado en agitador magnético durante 5 minutos a la temperatura correspondiente. El preparado fue filtrado a vacío por vidrio sinterizado. Fueron pesados nuevamente 4.0 g de hoja y agregados 20 mL del filtrado previamente obtenido, se repitió procedimiento. Por último, fueron medidos 10 mL del filtrado anterior y agregados a 2.0 g de hoja, machacado en mortero y colocado en agitador magnético durante 5 minutos a las temperaturas correspondientes. El preparado obtenido fue filtrado a vacío por vidrio sinterizado y el filtrado obtenido fue centrifugado durante 10 minutos a 6654 g a 4°C.

Se trabajo con agua destilada en dos condiciones de temperaturas distintas: 25 y 100°C.

Los extractos obtenidos fueron fraccionados y almacenados a -20°C.

4.1.2. Extractos etanólicos

A. Fueron pesados 2.0 g de hojas y drupas por separado, fueron agregados 10 mL de etanol, machacado en mortero y colocado en agitador magnético durante 5 minutos a la temperatura correspondiente. El preparado fue filtrado a vacío por vidrio sinterizado y el filtrado obtenido fue centrifugado durante 10 minutos a 6654 g a 4°C. Se trabajo con agua destilada en dos condiciones de temperaturas distintas: 25 y 40°C.

Los extractos etanólicos fueron colocados en rotavapor a 45°C, luego de evaporado el alcohol, el extracto seco fue resuspendido en 10 mL de agua destilada. Los extractos obtenidos fueron fraccionados y almacenados a -20 °C.

4.2. Determinación de actividad proteolítica

4.2.1. Método de Azocaseína (sustrato semi- sintético no específico)

Se determinó la actividad proteolítica utilizando azocaseína como sustrato por modificación del método de Andrew & Asenjo. Fueron mezclados y termostatizado en baño de agua a 37°C durante 5 minutos: 340 µL de solución azocaseína 1% y 340 µL de buffer fosfato de sodio 0.2 M pH 7.2. Fueron agregados 340 µL de muestra (mantenida en frío hasta el momento) y desarrollada la reacción en baño de agua a 37°C a tiempo final de acuerdo al ensayo. La reacción fue detenida con el agregado de 340 µL de TCA 10% y las muestras centrifugadas a 13000 rpm durante 30 minutos. Luego, fue medida la Ab_{337nm} . Para la preparación de los blancos, se realizó el agregado del TCA 10% previo al agregado de la muestra (Vallés, 2007).

Una unidad enzimática (U_{Azo}) queda definida como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento en una unidad de absorbancia a 337 nm en las condiciones del ensayo.

$$(U/mL) = \frac{(Ab_{337} \text{ muestra} - Ab_{337} \text{ blanco}) * FD}{0.34}$$

FD= Factor de Dilución

0.34= Volumen (mL) de enzima utilizados

4.3. Determinación de los Parámetros de Actividad de Tripsina con Azocaseína

4.3.1. Determinación de límites de la actividad de preparado enzimático a emplear según ensayo 4.2.1 .

Fue determinada la actividad proteolítica de distintas concentraciones de tripsina preparadas en buffer fosfato de sodio 0.2M pH 7.2 por método 4.2.1 a tiempo final 10 minutos. Fueron promediadas las medidas de actividad correspondiente a los ensayos realizados por triplicado.

4.3.2. Estudio de la actividad en el tiempo de reacción

Fue determinada la actividad de solución de tripsina (3.0- 3.3 U_{AZO}/mL: buffer fosfato de sodio 0.2M pH 7.2) por método 4.2.1 a los siguientes tiempos finales de incubación: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 minutos en las condiciones del ensayo. Fueron promediadas las medidas de actividad correspondiente a los ensayos realizados por triplicado.

4.3.3. Estudio de la actividad de la tripsina Vs concentración de sustrato

Fue determinada la actividad de tripsina (3.0- 3.3 U_{AZO}/mL: buffer fosfato de sodio 0.2M pH 7.2) por método 4.2.1 a los tiempos: 0, 3, 6, 9 y 12 minutos para cada una de las siguientes concentraciones de sustrato: 0.075, 0.10, 0.15, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 y 2.00 % (w/v). Fue calculada la velocidad de reacción (V_0) para cada concentración de sustrato. Los valores obtenidos de los ensayos realizados por triplicado fueron promediados.

4.4. Inhibición de tripsina con inhibidor serínico comercial (PMSF)

Se preparó una solución de PMSF 200 mM en metanol inmediatamente antes de ser usada.

4.4.1. Tiempos de inhibición enzimática

Fueron ensayados distintos tiempos de inhibición (0, 5, 10, 20, 30, 45 minutos) de tripsina (3.0- 3.3 U_{AZO}/mL: buffer fosfato de sodio 0.2M pH 7.2) con una concentración final fija de PMSF (2.0 mM) en baño de agua a 37°C. La actividad fue determinada mediante método 4.2.1 a tiempo final 10 minutos y se calculó actividad remanente (%AR) considerando como 100% de actividad la correspondiente a la solución de tripsina incubada con buffer fosfato de sodio 0.2M pH 7.2. Los valores obtenidos de los ensayos realizados por triplicado fueron promediados.

4.5. Búsqueda de actividad proteolítica en extractos vegetales

Fue realizada la búsqueda de actividad proteolítica por método 4.2.1 en todos los extractos vegetales obtenidos.

4.6. Búsqueda de actividad inhibitoria de tripsina en extractos de *S. molle*

Fueron mezclados 900µL de solución de tripsina (3.0- 3.3 U_{AZO}/mL: buffer fosfato de sodio 0.2M pH 7.2) con 100 µL de cada extracto durante 30 minutos en baño a 37°C. En el caso de los extractos de drupa, se realizó una dilución 1/3 de los mismos previo a la mezcla. Fue determinada la actividad mediante método 4.2.1. y se calculó %AR considerando 100% de actividad la correspondiente a la solución de tripsina incubada

con buffer de actividad en las condiciones del ensayo. Los valores obtenidos de los ensayos realizados por triplicado fueron promediados.

4.7. Determinación de parámetros de inhibición de tripsina con extractos de *S. molle* de mayor actividad inhibitoria

4.7.1. Tiempos de inhibición enzimática

Fueron mezclados 900 μ L de solución de tripsina (3.0- 3.3 U_{AZO}/mL: buffer fosfato de sodio 0.2M pH 7.2) con 100 μ L de extracto. En caso del extracto de drupa, se realizó una dilución 1/3 del mismo previa a la mezcla. Los tiempos de inhibición ensayados fueron: 0, 5, 10, 20, 30, 45 minutos en baño a 37°C. La actividad fue determinada mediante el método 4.2.1 a tiempo final 10 minutos. Fueron promediados los valores obtenidos por triplicado en las condiciones de ensayo.

4.7.2. Determinación del tipo de inhibición- Diagrama Lineweaver-Burke

Fueron mezclados 900 μ L de solución de tripsina (610- 625 U_{BAEE}/mL, buffer fosfato de sodio 67 mM pH 7.6) con distintos volúmenes de extractos seleccionados: 0, 6.0, 10.0, 20.0, 40.0 y 60.0 μ L. En todos los casos fueron alcanzados los 1000 μ L de mezcla con buffer fosfato de sodio 67 mM. Se incubó durante 5 minutos en baño a 25°C. La actividad enzimática fue determinada por el método 4.2.2 con distintas concentraciones de BAEE (0.05, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.3 y 0.5 mM).

4.7.3. Tratamiento de datos

Fue llevada a cabo la linealización de los datos obtenidos en 4.7.2 para cada volumen de extracto incubado con la solución de tripsina a través de la relación $1/V_0$ Vs $1/[BAEE]$. A partir de la pendiente de la recta obtenida de la solución de tripsina sin inhibir con extracto, se determinó K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de la reacción en las condiciones de ensayo a través de la relación: pendiente= $K_m/V_{m\acute{a}x}$; corte con eje de ordenadas= $1/V_{m\acute{a}x}$.

4.7.4. Determinación de IC_{50} por método 4.2.1

Fueron mezclados 900 μ L de solución de tripsina (3.0- 3.3 U_{AZO}/mL : buffer fosfato de sodio 0.2M pH 7.2) con distintos volúmenes de extracto de hoja y drupa: 0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 60.0 y 100 μ L. En todos los casos fueron alcanzados los 1000 μ L de mezcla con buffer fosfato de sodio 0.2M. Se incubó durante 5 minutos en baño a 37°C. La actividad fue determinada mediante método 4.2.1 a distintos tiempos (0, 3, 6, 9 y 12 minutos).

4.7.5. Determinación de IC_{50} por método 4.2.2

Fueron mezclados 900 μ L de solución de tripsina (610- 625 U_{BAEE}/mL , buffer fosfato de sodio 67 mM pH 7.6) con distintos volúmenes de extracto de hoja y drupa: 0, 6.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 y 60.0 μ L. En todos los casos fueron alcanzados los 1000 μ L de mezcla con buffer fosfato de sodio 67 mM. Se incubó durante 5 minutos en baño a 25°C y fue determinada la actividad mediante método 4.2.2.

4.7.6. Tratamiento de datos

A partir de los datos obtenidos en 4.7.4 y 4.7.5 se gráfico $1/V_0$ Vs volumen de extracto ensayado. El corte obtenido de esta recta con el eje de las abscisas= IC_{50} según el gráfico de Dixon.

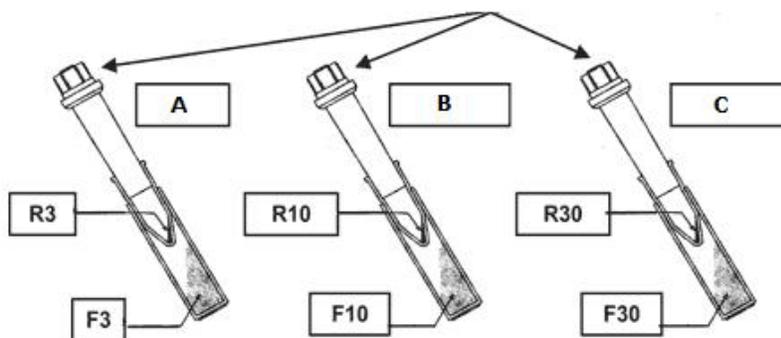
4.8. Evaluación del extracto acuoso de hoja extraído a 100°C en 5 minutos de agitación

4.8.1. Estudio de pH óptimo de inhibición

Se mezclaron 900 μ L de tripsina (3.0- 3.3 U_{AZO}/mL) con 100 μ L de extracto en baño de agua a 37°C durante 5 minutos a distintos pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.6, 8.0, 9.0 y 10). Fue determinada la actividad mediante método 4.2.1 a tiempo final de 10 minutos. Se utilizo como control, la enzima incubada a los mismos valores de pH sin inhibidor.

4.8.2. Fraccionamiento por tamaño molecular

Se fraccionaron 2mL de extracto utilizando centricones con membranas de distinto corte (3, 10 y 30 KDa).



Se realizó búsqueda de actividad inhibitoria en las fracciones de distintos tamaños moleculares de igual manera que método 4.6.

Resultados & Discusión

5.1. Preparación de extractos

Las condiciones de obtención de extractos de drupas y hojas de *S. molle* (solventes, temperaturas, tiempo de agitación y modalidad de extracción) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1- Obtención de extractos de drupas y hojas de *S. molle*.

Nº	Órgano	Tiempo agitación	Modalidad	Solvente	T (°C)	pH*	Descripción del extracto
1	Drupas	5 min	simple	agua	25	4.0	Verde limón
2	Drupas	5 min	simple	agua	100	4.0	Amarillo oscuro
3	Drupas	5 min	simple	etanol	25	4.0	Verde oscuro
4	Drupas	5 min	simple	etanol	40	5.0	Verde oscuro
5	Hoja	5 min	simple	agua	25	5.0	Beige oscuro
6	Hoja	5 min	simple	agua	100	5.0	Beige oscuro
7	Hoja	5 min	simple	etanol	25	5.0	Beige anaranjado oscuro
8	Hoja	5 min	simple	etanol	40	5.0	Beige anaranjado
9	Hoja	24 hrs	simple	agua	25	5.0	Marrón claro
10	Hoja	48 hrs	simple	agua	25	5.0	Marrón claro
11	Hoja	5 min	seriada	agua	25	5.0	Marrón oscuro
12	Hoja	5 min	seriada	agua	100	5.0	Marrón oscuro

*pH propio del extracto

Los extractos presentaron gran variabilidad en sus propiedades físicas y organolépticas, tales como viscosidad, turbidez y olor. Esto podría deberse a la extracción diferencial de componentes químicos o la diferente concentración de los mismos en el extracto, debido a distintas combinaciones de las condiciones de extracción (tiempo de agitación, temperatura, solvente, etc.).

Fue evidente una notoria diferencia en las propiedades físicas y organolépticas entre los extractos de drupa y los extractos de hoja y entre los extractos de hoja obtenidos a mayor tiempo de agitación, en forma seriada seriados y los obtenidos en 5 minutos.

A cada uno de los extractos se les determinó la actividad proteolítica, a fin de descartar interferencias con posibles proteasas presentes en los mismos. No se detectó actividad proteolítica para ninguno de los extractos por el método 2.1.

5.2. Determinación de los Parámetros de Actividad de Tripsina con Azocaseína

5.2.1. Dilución del preparado enzimático a emplear según los límites de detección del ensayo

Se realizaron diferentes diluciones del preparado de tripsina de tal manera que los valores de absorbancia obtenidos permitieran el adecuado seguimiento de los valores de los mismos resultantes. La solución seleccionada fue la que presentó una actividad entre 3.0 y 3.3 U_{AZO}/mL.

5.2.2. Estudio de la V_0 en las condiciones de actividad seleccionada

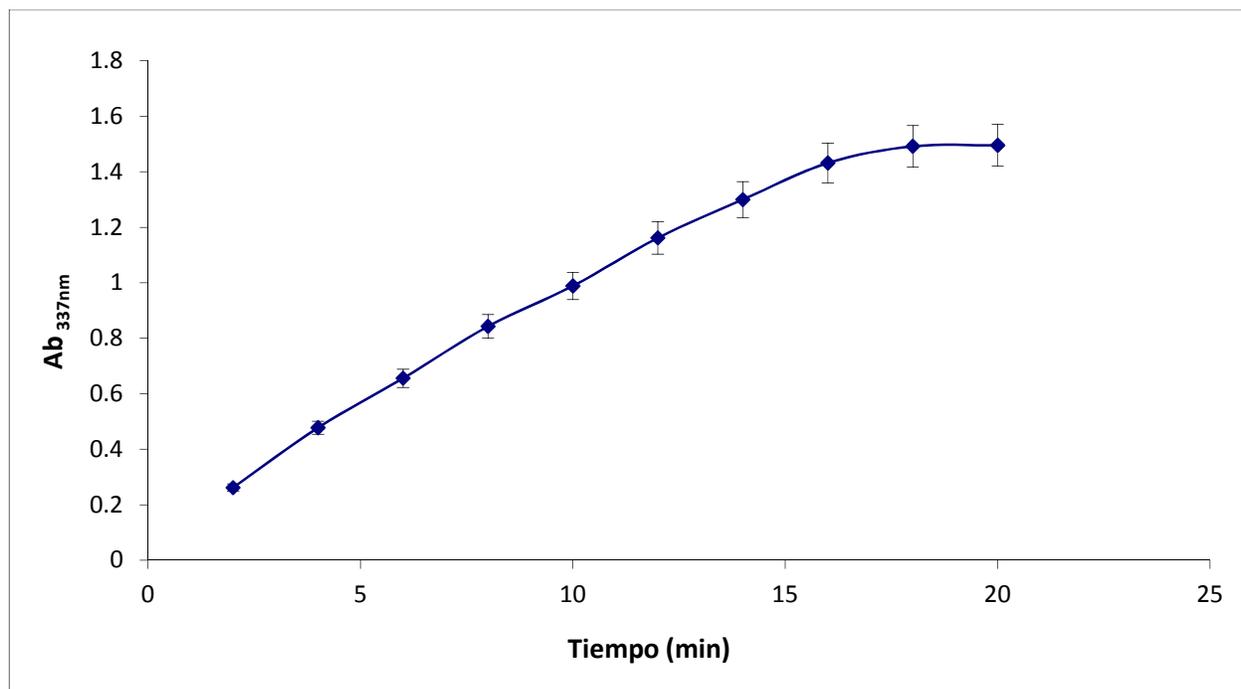


Figura 11- Abs. _{337nm} Vs tiempo de incubación.

Se observa una relación lineal entre Ab_{337nm} y el tiempo de incubación hasta los 15 minutos. Se seleccionó este período de tiempo para trabajar en las siguientes condiciones: 3.0- 3.3 U_{AZO}/mL, 1% azocaseína (%w/v), 37°C y pH 7.2.

5.2.3. Efecto de la concentración de sustrato en la V_0

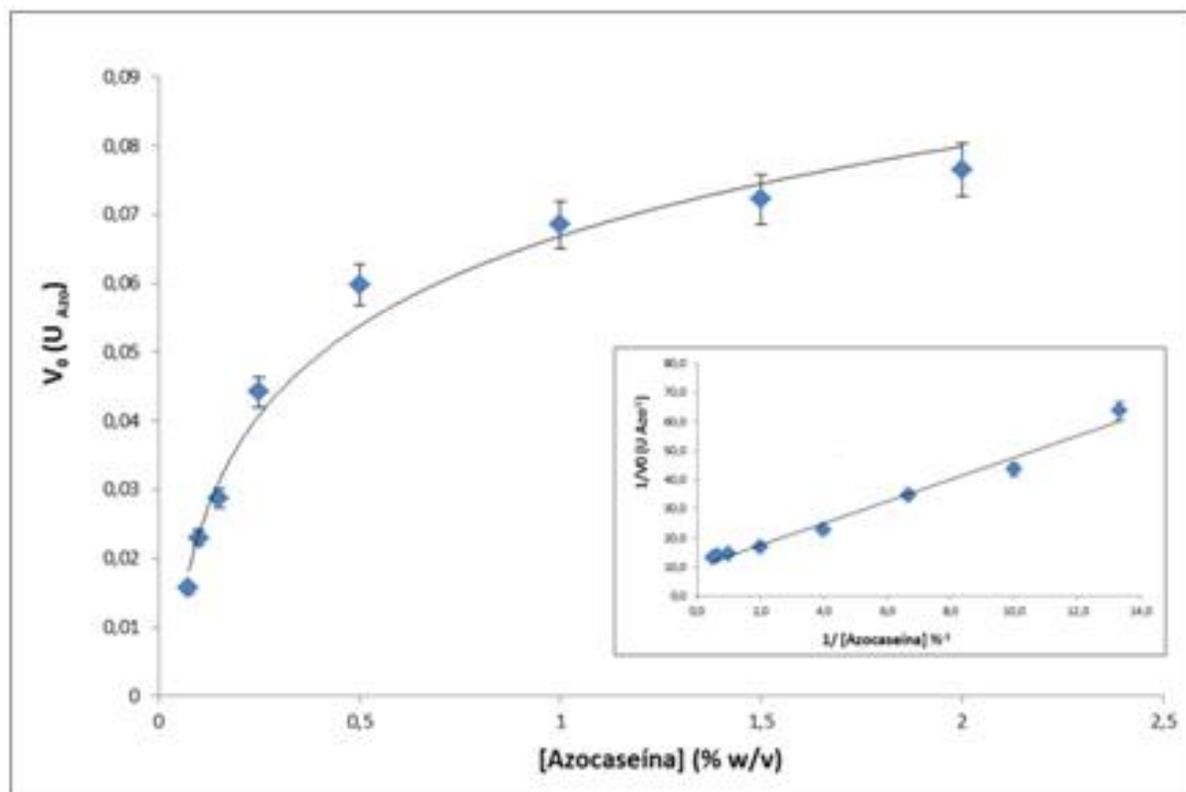


Figura 12- V_0 (U_{AZO}) Vs [Azocaseína] (% w/v).

Al estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. A concentraciones bajas de azocaseína (hasta 0.25%), la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas concentraciones, la enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de la concentración inicial de sustrato. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima. La relación observada entre V_0 y la concentración de sustrato describen una hipérbola del tipo Michaelis- Mentel. Se observa saturación con el sustrato a partir de concentraciones mayor o igual 1.0 % (w/v) del mismo (Figura 12).

5.3. Inhibición de tripsina con PMSF

5.3.1. Evaluación de %AR en función del tiempo de inhibición

La acción inhibitoria del PMSF (2mM) fue ensayada a distintos tiempos, se muestra en la Figura 13.

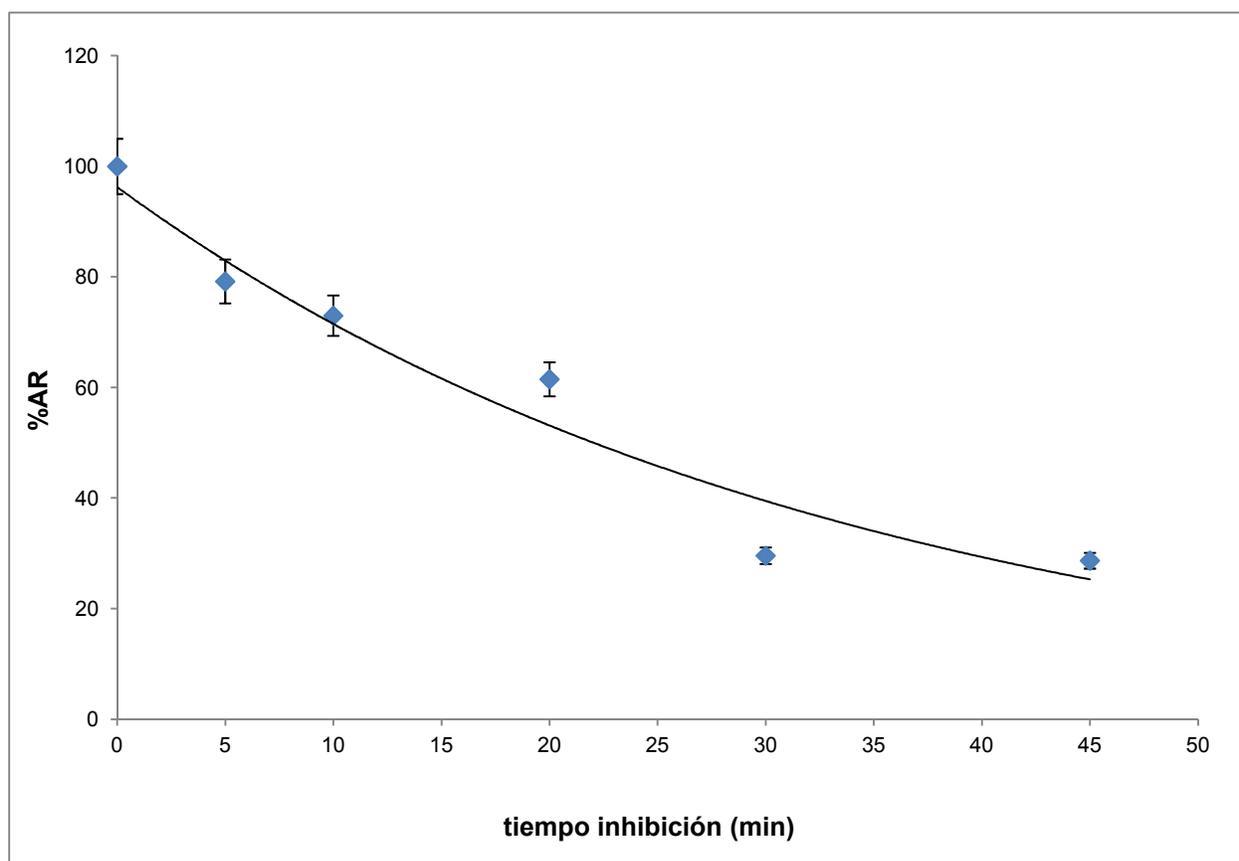


Figura 13- % AR Vs tiempo inhibición a 37°C y 2 mM PMSF.

En el caso de la inhibición irreversible, el inhibidor no se encuentra en equilibrio con el complejo enzima-inhibidor. La inhibición irreversible se caracteriza por un aumento progresivo en el tiempo, llegando en última instancia a la inhibición completa, siempre que el inhibidor esté en exceso con respecto a la concentración de enzima presente. Se

obseó una dependencia entre el %AR y el tiempo, donde la inhibición decae exponencialmente a lo largo del tiempo lo cual es esperable al tratarse de un inhibidor de tipo irreversible. Entre los 30 y 45 minutos ya no se observaron cambio en el decaimiento de actividad en las concentraciones de PMSF utilizadas (2mM).

5.3.2. V_0 en función de la concentración de inhibidor

Se evaluó el efecto sobre V_0 con la variación en la concentración final de inhibidor utilizando azocaseína y BAEE como sustratos (Figuras 14 y 15, respectivamente)

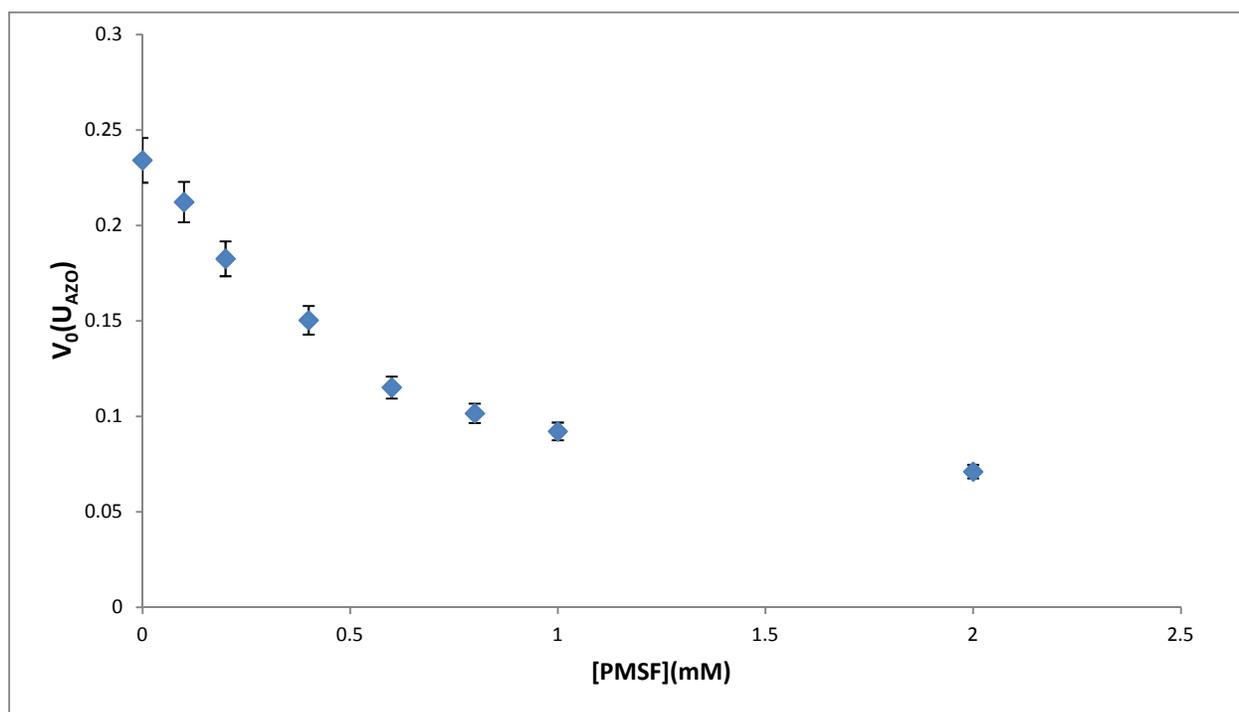


Figura 14- V_0 (U_{AZO}) Vs [PMSF]

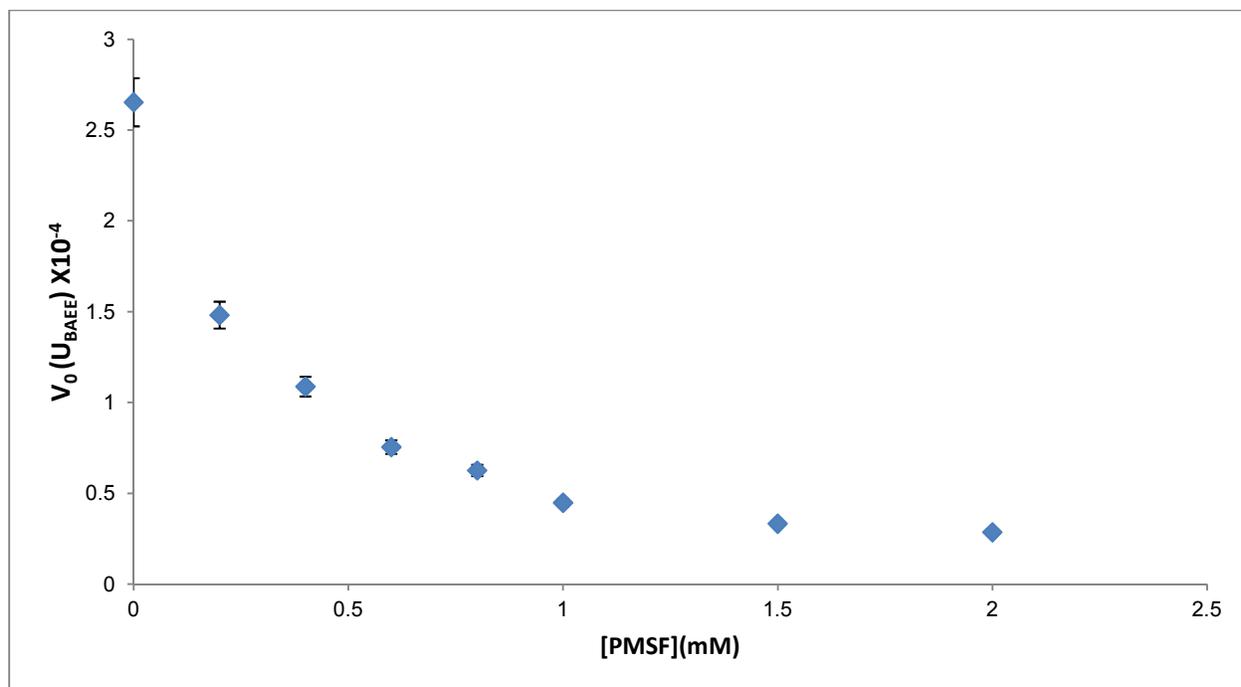


Figura 15- $V_0(U_{BAEE})$ Vs $[PMSF]$

En las condiciones del ensayo, la solución de tripsina no se llega a inhibir completamente con 2 mM PMSF. No fue posible ensayan concentraciones finales mayores a 2 mM del inhibidor debido ya que este precipitó una vez mezclado con tripsina.

5.4. Búsqueda de actividad inhibitoria de tripsina en extractos vegetales

% AR de tripsina incubada extractos de drupas y hojas (Figura 16). En el caso de los extractos de drupa fue necesario emplear diluciones de los mismos, como se describe en metodología, debido a las interferencias en las medidas espectrofotométricas de la actividad (blancos muy altos).

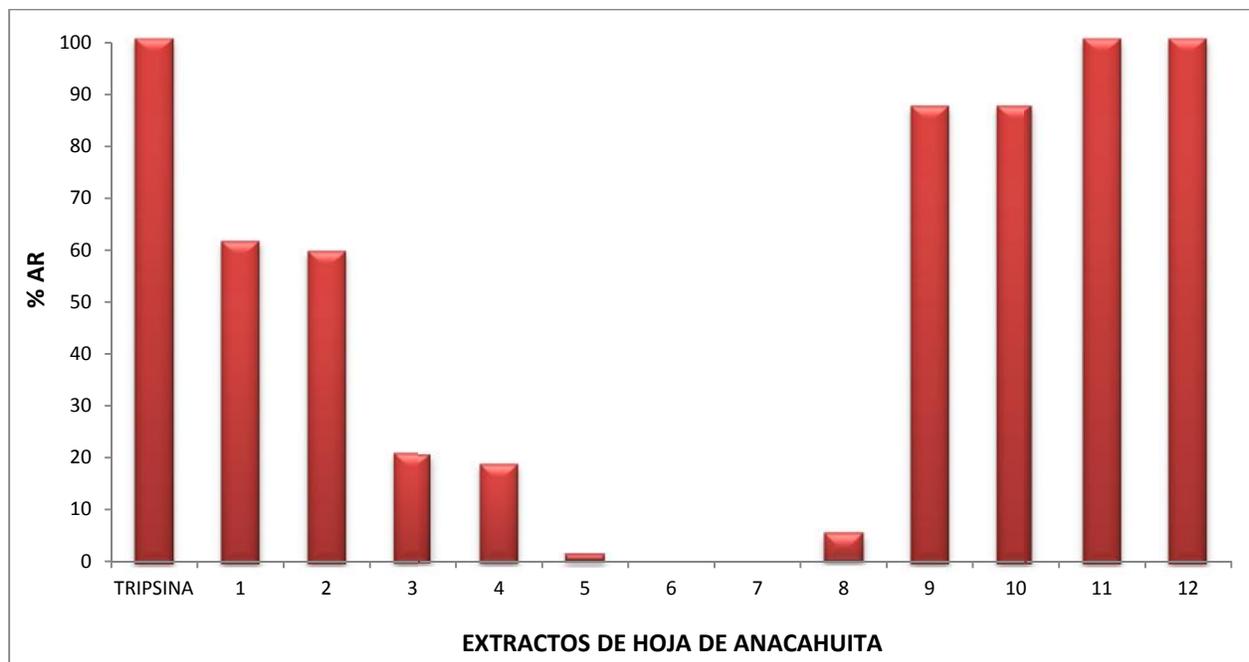


Figura 16- % AR de tripsina inhibida extracto de drupas y hojas de *S. molle*.

La inhibición de tripsina alcanzó valores de 60% con los extractos 1 y 2 y un 80% con los extractos 3 y 4. Lo que muestra que el etanol como solvente en la obtención de extractos de drupa incrementa la capacidad inhibitoria.

El 100% de inhibición de tripsina se alcanzó con los extractos 5- 8.

Los extractos 9 y 10 produjeron un 13% de inhibición de tripsina, mientras que los seriados 11 y 12 no manifestaron capacidad inhibitoria.

Los extractos de hojas que presentaron la mayor capacidad inhibitoria (prácticamente 100%) fueron obtenidos con tan solo 5 minutos de agitación. A tiempos mayores, de agitación, se observó una importante pérdida de la capacidad inhibitoria. Esto podría deberse a que el inhibidor perdió su estructura funcional por el efecto de la agitación prolongada o se extrajeron otros fitoquímicos presentes en el vegetal que interfirieron con el mecanismo de inhibición. La pérdida de capacidad inhibitoria que mostraron los extractos obtenidos en forma seriada podría deberse al mismo efecto. La obtención de extractos se llevo a cabo mediante un método fácil y rápido en el laboratorio, obteniéndose la mayor capacidad inhibitoria (prácticamente del 100%) en los extractos obtenidos a partir de hojas en tan sólo 5 minutos de agitación.

Se seleccionaron los extractos 2 y 6 para realizar la evaluación de la capacidad inhibitoria de tripsina de los mismos, debido a que el extracto 6 presentó el 100 % de inhibición y el extracto 2 fue extraído en las mismas condiciones.

5.5. Evaluación de la inhibición de tripsina de los extractos 2 y 6 de *S. molle*

5.5.1. Evaluación de %AR en función del tiempo de inhibición

%AR de tripsina en función del tiempo de inhibición de los extractos 2 y 6 (Figura 17).

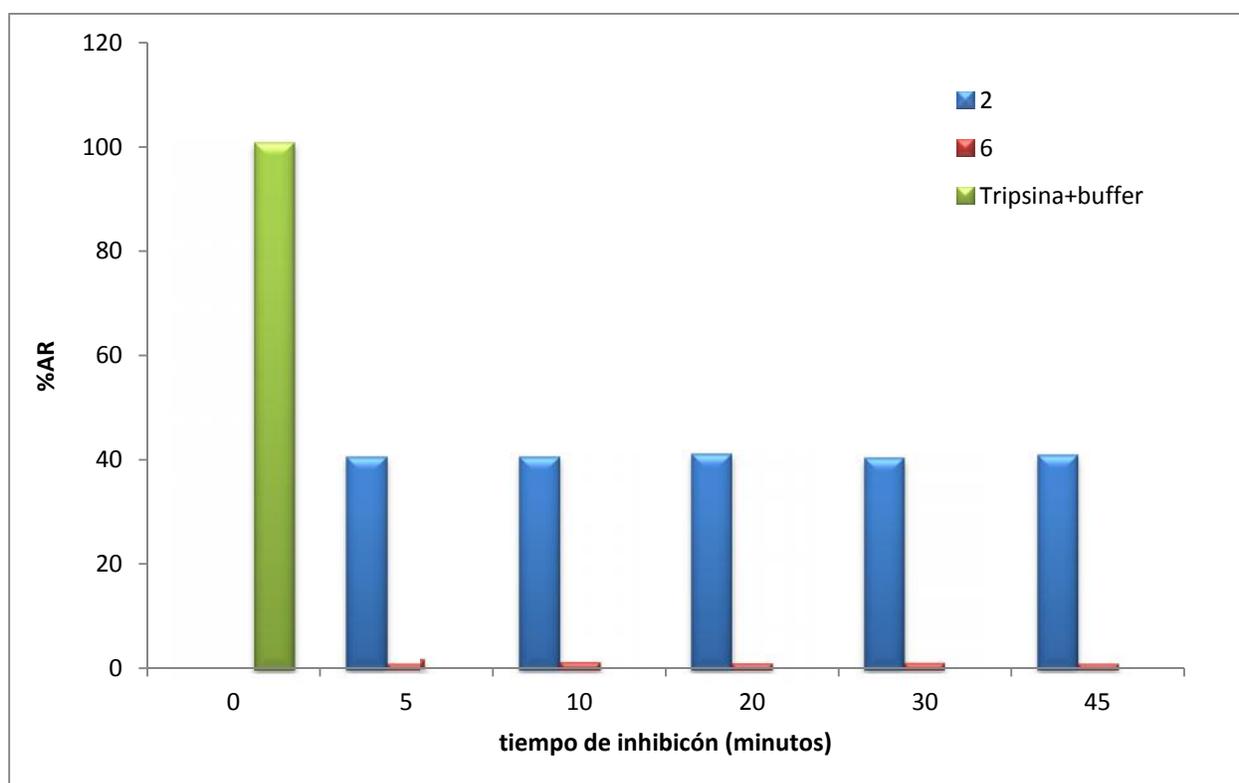


Figura 17- % AR de tripsina inhibida extractos 2 y 6.

En las condiciones de ensayo el máximo de capacidad inhibitoria de estos extractos fue alcanzado a los 5 minutos permaneciendo invariable hasta los 45 minutos.

5.5.2. Parámetros de la actividad de tripsina usando BAEE como sustrato

1/V₀ en función de 1/[BAEE]

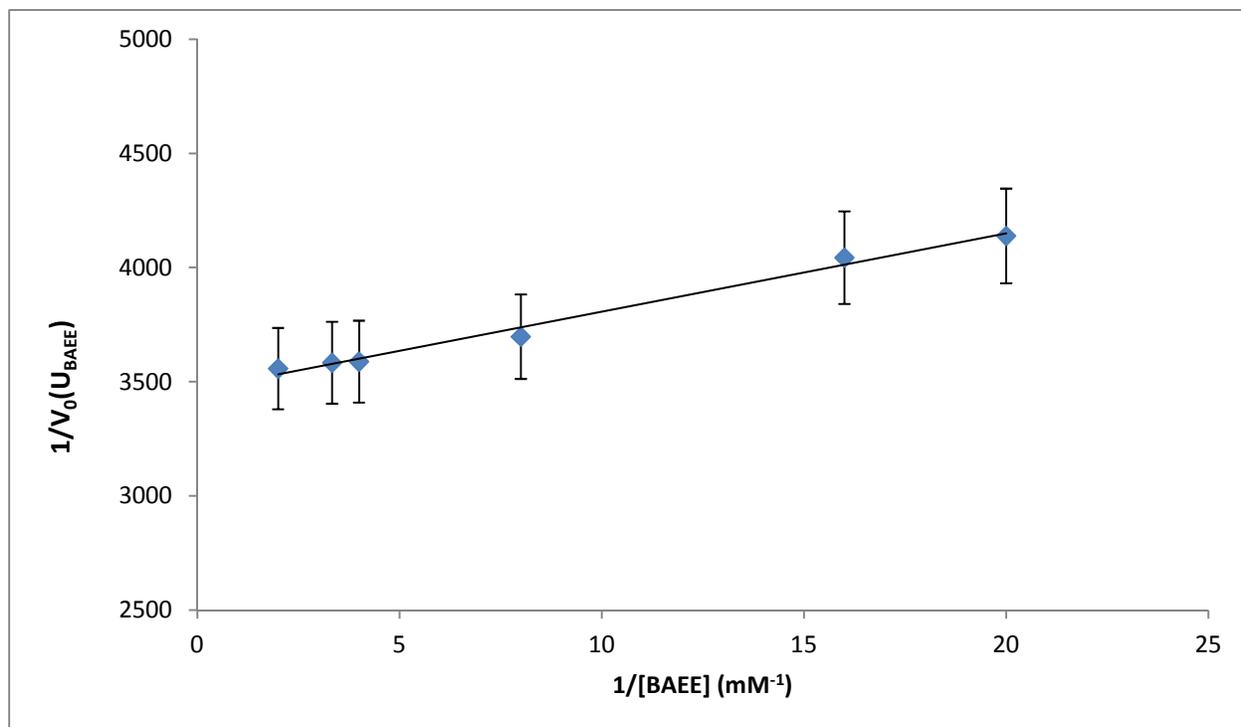


Figura 18- 1/V₀ en función de 1/[BAEE]

A partir de la recta de la Figura 18 se determinó la K_m en 9.8 X10⁻³ mM y V_{máx} 2.886 U_{BAEE} para la tripsina en las condiciones ensayadas.

5.5.3. Tipificación de la inhibición

Determinación del tipo de inhibición del extracto 2

Diagrama de Lineweaver- Burke para tripsina inhibida con distintas concentraciones de los extractos 2 (Figura 19).

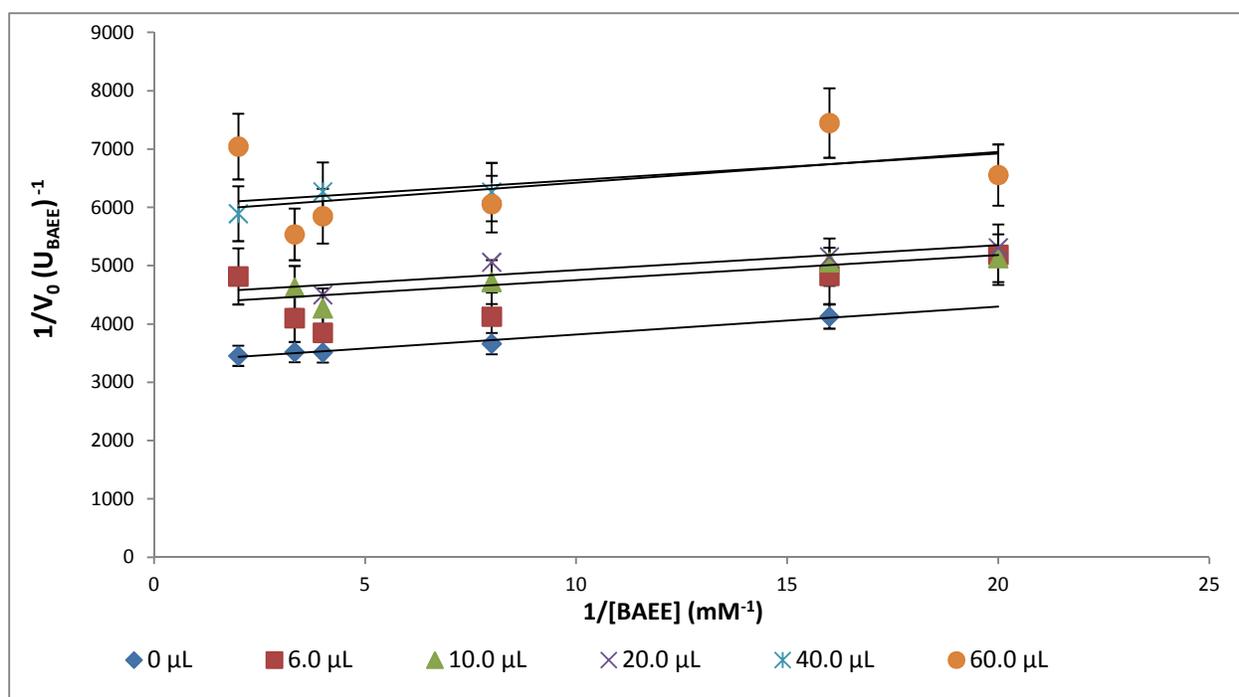


Figura 19- Diagrama de Lineweaver- Burke para tripsina inhibida con extracto 2.

A partir de este gráfico, se pudo inferir una inhibición del tipo acompetitiva para el extracto 2. Al tratarse de una inhibición reversible, es esperable que la capacidad inhibitoria sea independiente del tiempo de inhibición, una vez que se alcanza el equilibrio, como se pudo observar (Figura 17).

Determinación del tipo de inhibición del extracto 6

Diagrama de Lineweaver- Burke para tripsina inhibida con distintas concentraciones de los extractos 6 (Figura 20).

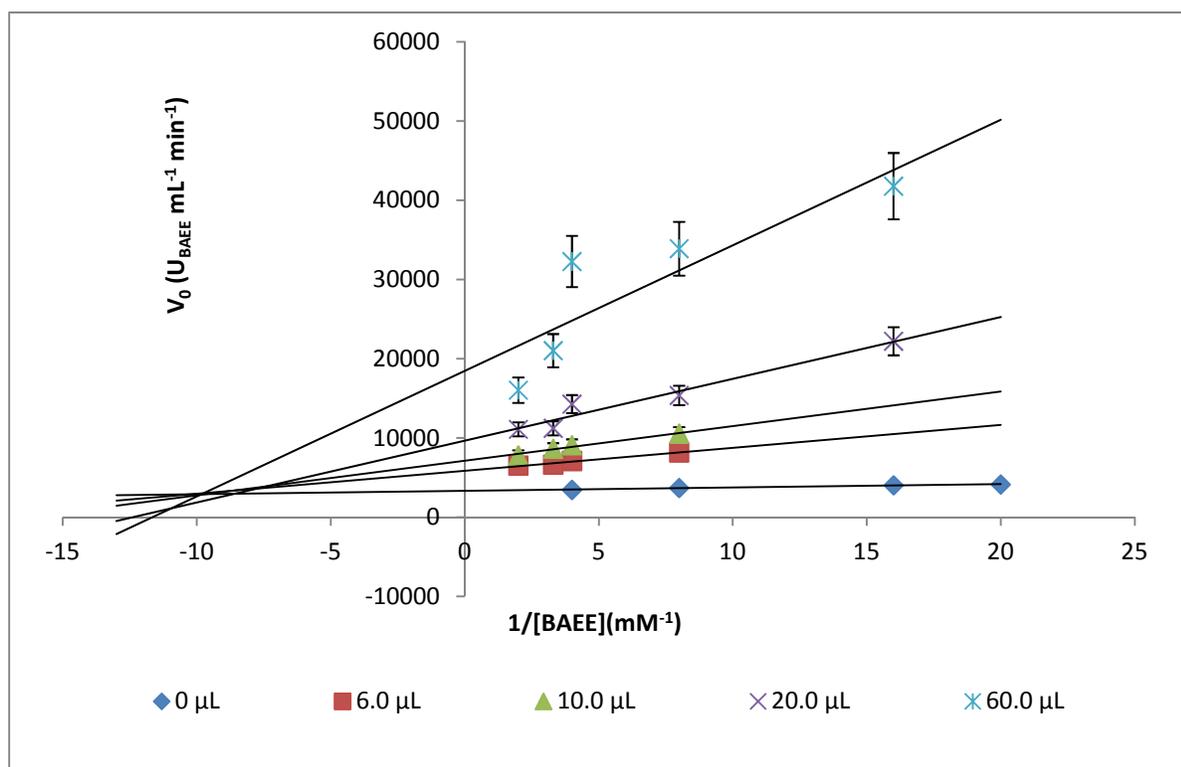


Figura 20- Diagrama de Lineweaver- Burke para tripsina inhibida con extracto 6

A partir del gráfico, se pudo inferir una inhibición del tipo mixta para el extracto 6. Al tratarse de una inhibición reversible es esperable, que la capacidad inhibitoria sea independiente del tiempo de inhibición, una vez alcanzado el equilibrio, como se pudo observar (Figura 20).

La adjudicación de este tipo de inhibición acompetitiva o mixta según el caso, corresponde al comportamiento de cada uno de los extractos (2 y 6) y no a los inhibidores aislados y purificados. Esto señala la necesidad de continuar con la purificación y tipificación de los inhibidores aislados en estudios posteriores.

5.5.4. Determinación de IC_{50}

Determinación de IC_{50} del extracto 2.

Se evaluó la variación en la V_0 de tripsina a distintas concentraciones de los extractos 2 utilizando azocaseína y BAEE como sustrato. Se determinó el diagrama de Dixon en cada caso (Figuras 21 y 22, respectivamente).

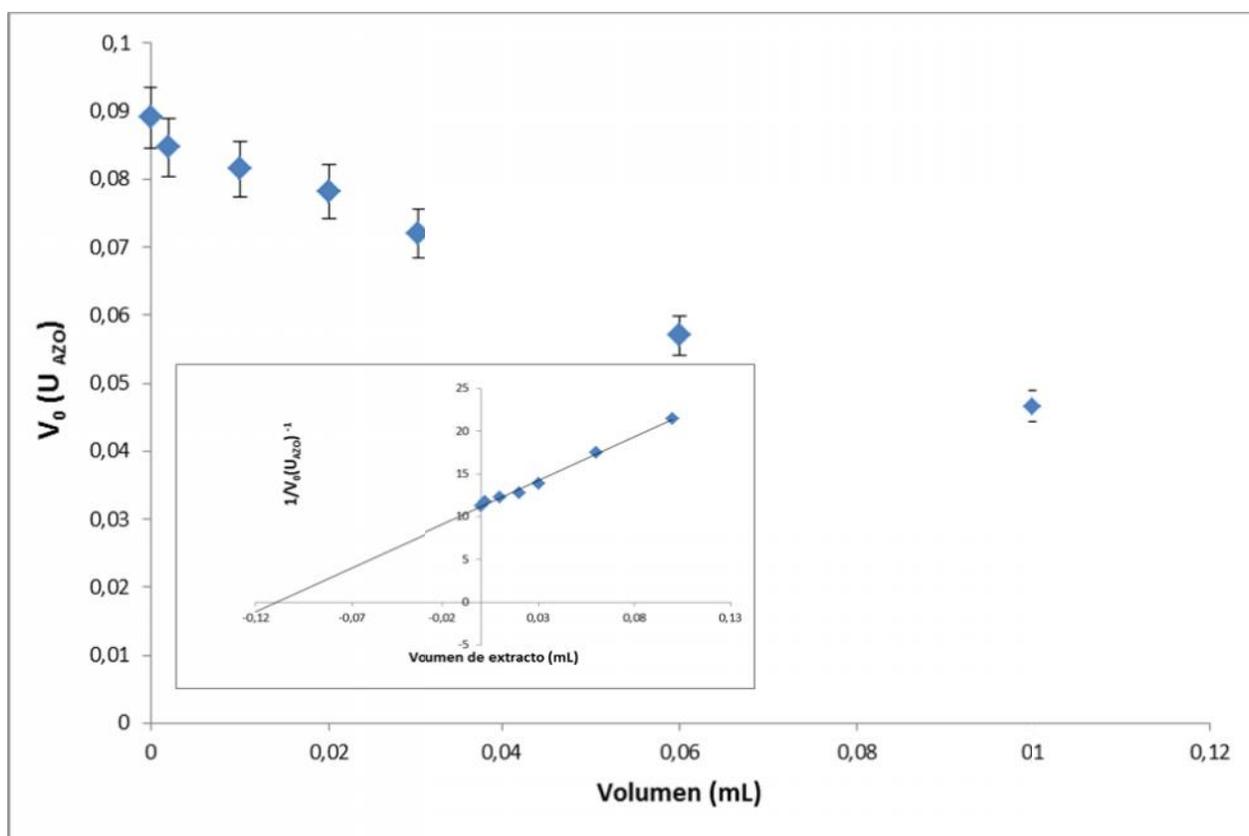


Figura 21- $1/V_0$ Vs volumen de extracto. Diagrama de Dixon para tripsina inhibida con extracto 2 utilizando azocaseína como sustrato.

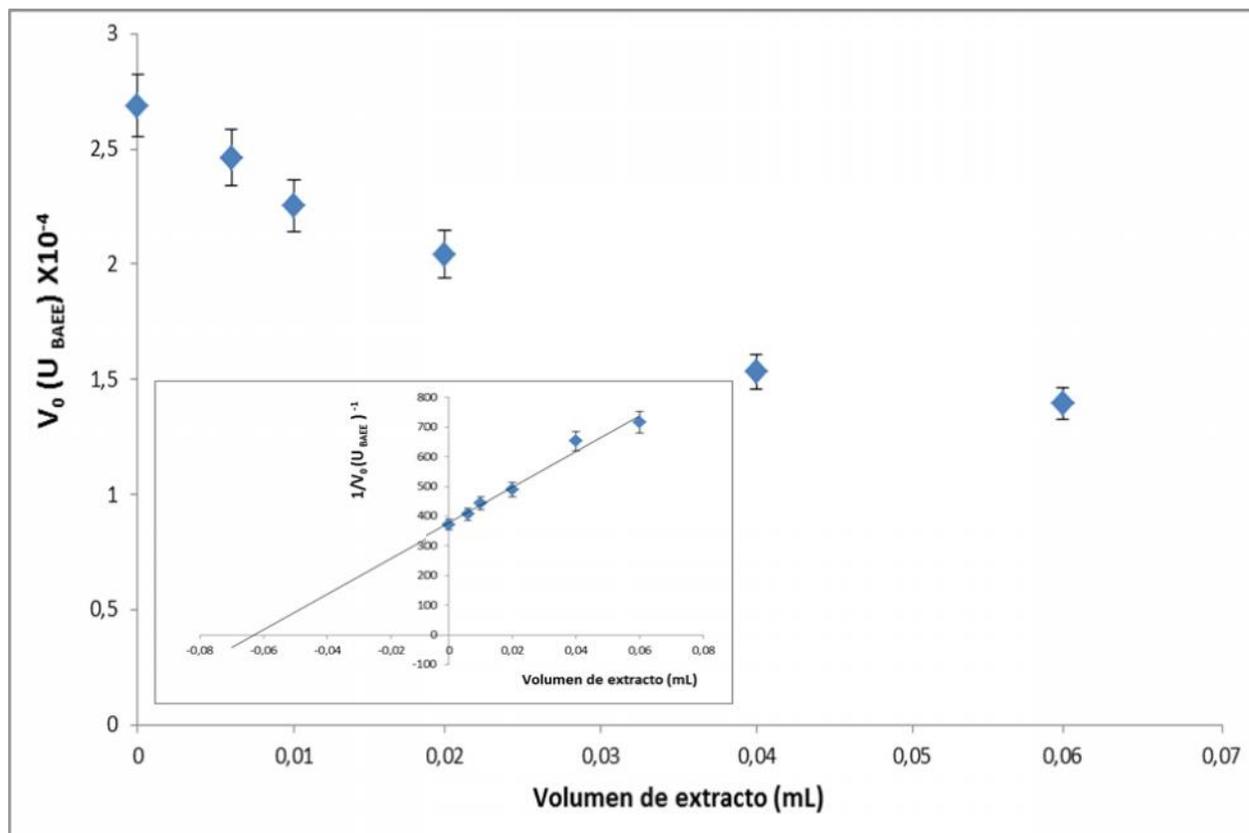


Figura 22- $1/V_0$ Vs volumen de extracto. Diagrama de Dixon para tripsina inhibida con extracto 2 utilizando BAE como sustrato.

El IC_{50} determinado para el extracto 2 fue de 109 y 63 μ L.

Determinación de IC_{50} del extracto 6

Se evaluó la variación en la V_0 de tripsina a distintas concentraciones de los extractos 6 utilizando azocaseína y BAE como sustrato (Figuras 23 y 24, respectivamente). Se realizó Diagrama de Dixon en cada caso.

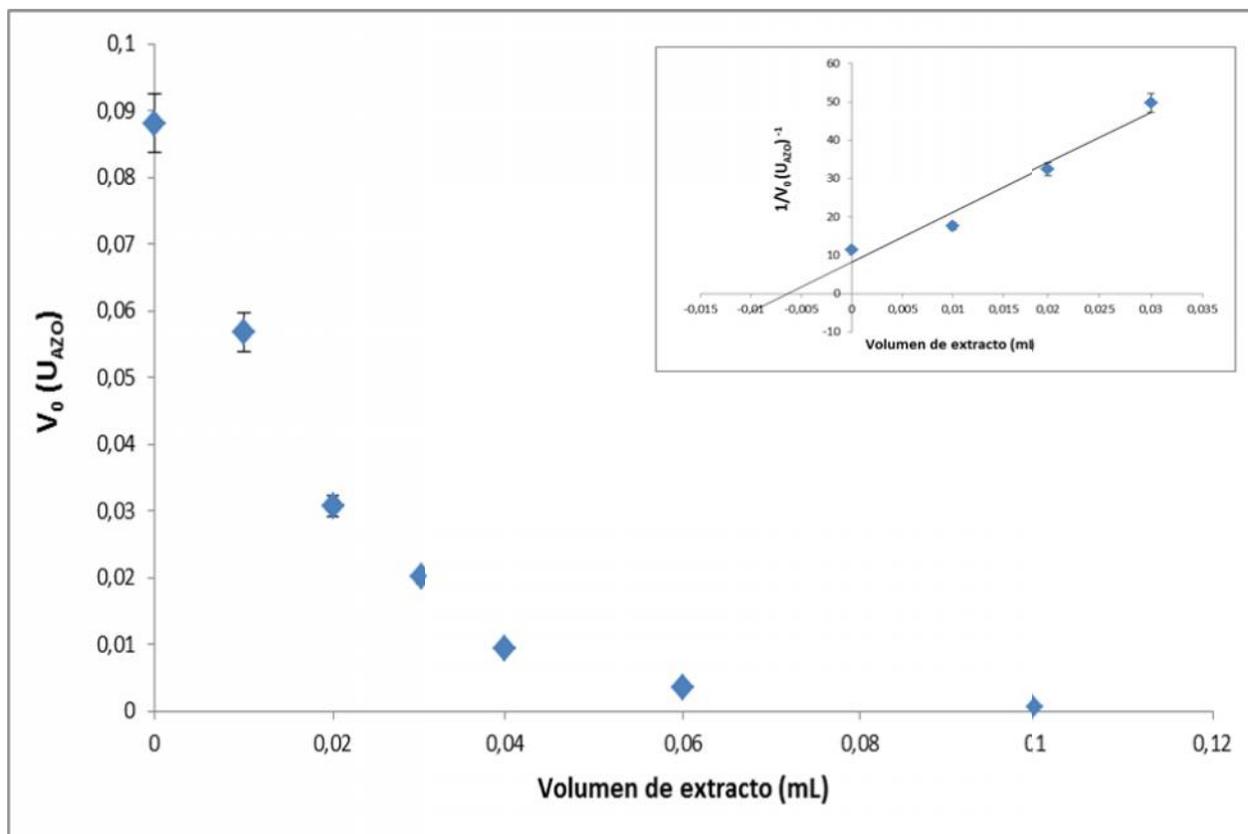


Figura 23- $1/V_0$ Vs volumen de extracto. Diagrama de Dixon para tripsina inhibida con extracto 6 utilizando azocaseína como sustrato.

El IC_{50} determinado para el extracto 6 fue de 6 y 9 μ L.

Las diferencias entre los valores de IC_{50} para un mismo extracto determinado por los distintos métodos, puede deberse fundamentalmente a las diferencias termodinámicas existentes entre ambos ensayos, dado que uno se lleva a cabo a 25 y el otro a 37 °C. A pesar de ello, el extracto 6 manifestó valores, determinados por ambas metodologías, 10 veces menores. Dado que los volúmenes determinados necesarios para alcanzar el 50% de inhibición con el extracto 6, son realmente pequeños, y se llega al 100% de inhibición (lo cual no sucede con el extracto 2 en las condiciones ensayadas), se decidió continuar la evaluación del mismo.

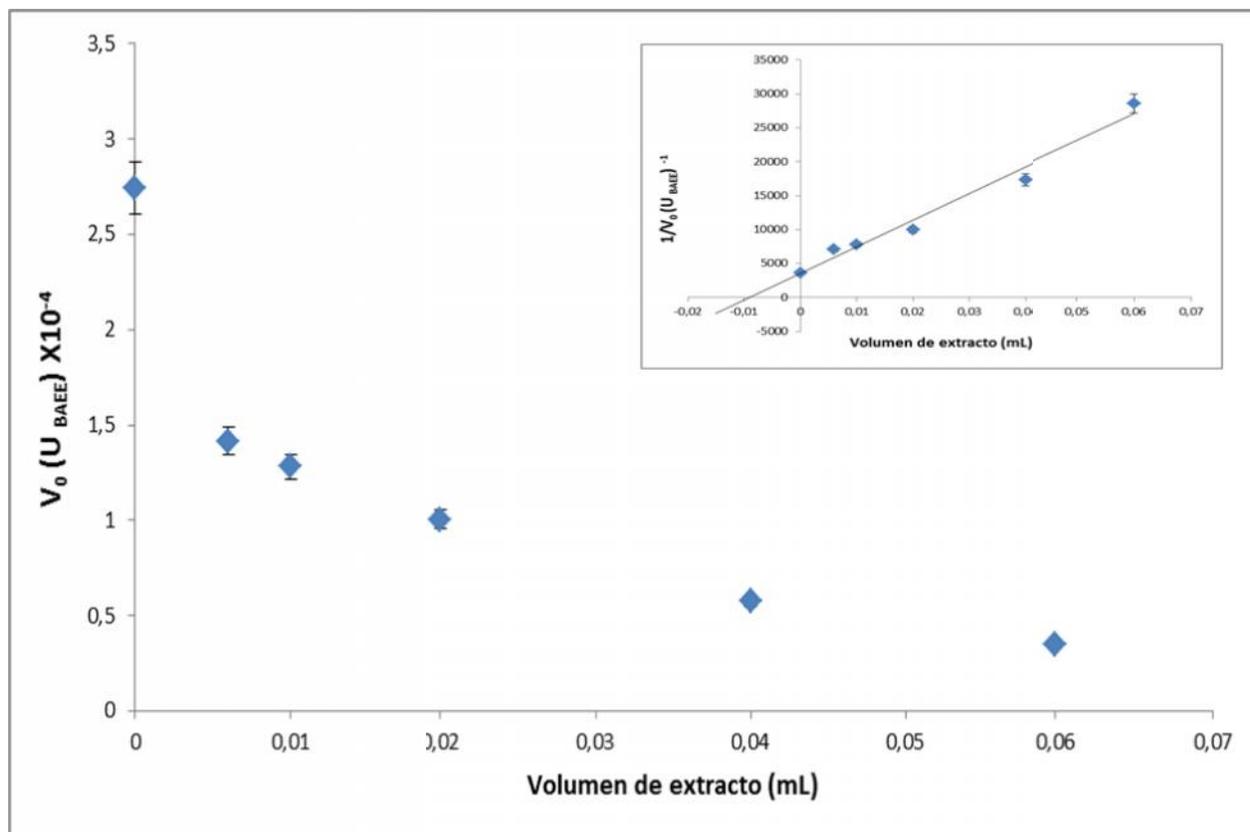


Figura 24- $1/V_0$ Vs volumen de extracto. Diagrama de Dixon para tripsina inhibida con extracto 6 utilizando BAAE como sustrato

5.6. Evaluación del extracto 6

5.6.1. Determinación de pH óptimo de la inhibición 12

Efecto del pH en la actividad de la tripsina y la inhibición con extracto 6 (Figura 25).

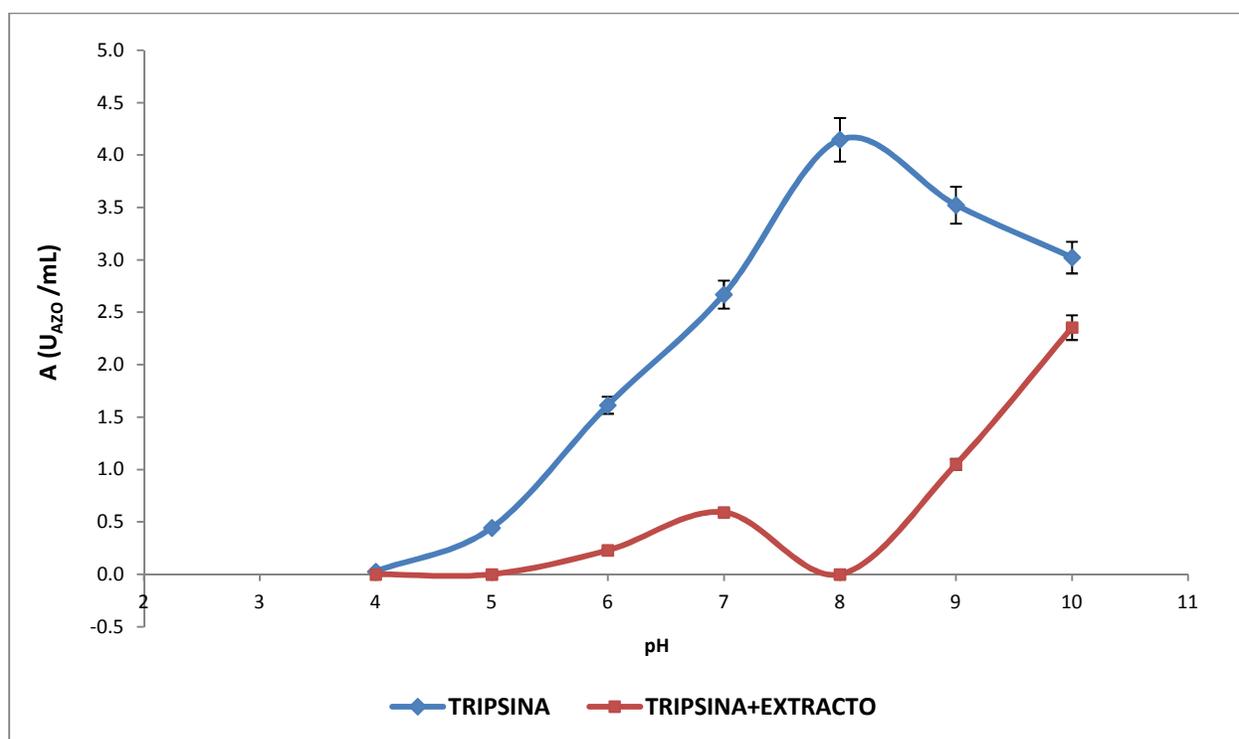


Figura 25- A (U_{AZO}/mL) de tripsina incubada extracto 6 a distintos pH (4.0- 5.0, Buffer acetato 0.1 M; 6.0- 7.0, Buffer fosfato de sodio 0.1M; 8.0- 9.0, Buffer Tris- HCl 0.1M; 10.0, Buffer Glicina- NaOH 0.1M).

Se observó 100 % de inhibición de extracto a pH 8.0 a 37°C, en baño de agua durante 5 minutos. Este estudio de pH óptimo para la tripsina y para la inhibición mostró que la mayor capacidad inhibitoria coincide con el pH óptimo de la actividad catalítica de la enzima. Obteniéndose un 100% de inhibición en las condiciones de pH (8.0) y temperatura (37°C) óptimas para la enzima.

Esta excelente capacidad inhibitoria podría deberse a que en estas condiciones óptimas de trabajo para la enzima, la tripsina tiene una conformación donde su sitio activo se ve

más expuesto. Esto le permite al biocatalizador desplegar una gran actividad como se observa en el gráfico, pero a su vez, podría estar más vulnerable frente a los inhibidores. Viéndose en presencia de estos mucho más afectada la actividad cuando el sitio activo está más expuesto, dependiendo claro, del mecanismo y el lugar de unión del inhibidor.

5.6.2. Búsqueda de actividad inhibitoria de tripsina en fracciones de distinto tamaño molecular de extracto de *S. molle*

En la Figura 23 se muestra %AR de tripsina incubada con fracciones de extracto de *S. molle* de distinto tamaño molecular (< 3kDa; >3kDa y <10kDa; >10kDa; >30kDa).

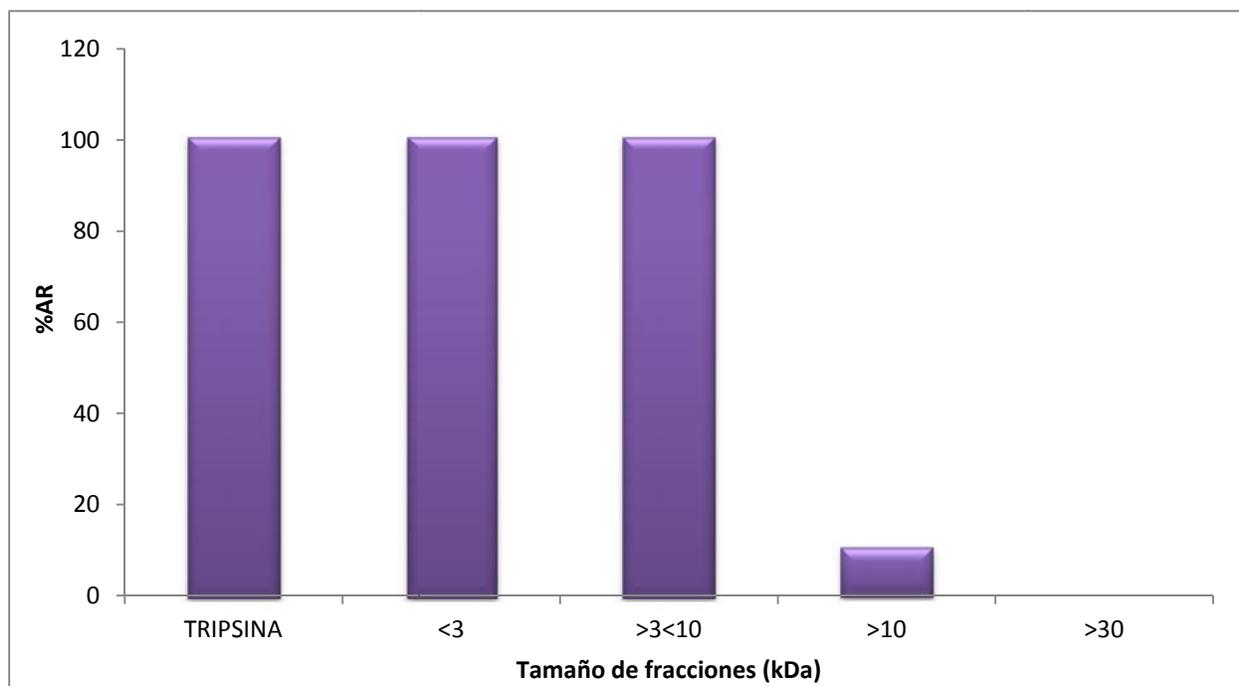


Figura 23- %AR de tripsina inhibida por distintas fracciones moleculares de extracto 6 (< 3kDa; >3kDa y <10kDa; >10kDa; >30kDa).

Las fracciones con tamaños <10 kDa no muestran capacidad inhibitoria. La actividad de los inhibidores presentes en el extracto se observan en las fracciones de tamaño >10

kDa, observándose el 100 % de inhibición de tripsina en la fracción de tamaño > 30kDa.

Es el primer reporte de existencia de inhibidores proteolíticos, específicamente de tipo antitripsina, en *Schinus molle*. Los extractos obtenidos a partir de drupas y hojas presentaron alta actividad inhibitoria frente a este biocatalizador serínico. Al día de hoy se conocen muy pocas fuentes naturales de inhibidores naturales con actividad antitripsina específicamente (Habib, 2007).

La extracción de inhibidores a partir de material vegetal de *S. molle* se realizó, en el laboratorio, mediante un método fácil, rápido y económico.

De acuerdo a la bibliografía, los inhibidores de los tipos Bowman Birk, Squash, Cereal y Mustard muestran actividad inhibitoria frente a proteasas serínicas, incluso alguno de ellos actividad antitripsina. En todos los casos la actividad inhibitoria viene dada por pequeños polipéptidos de tamaño menor a 10 kDa (Habib, 2007). En nuestro caso, las mejores capacidades inhibitorias corresponde a tamaño molecular >10 kDa, siendo de excelencia para la fracción >30 kDa. Esto nos permite decir que no son péptidos de < 10kDa los responsables de la capacidad inhibitoria de *S. molle*.

Los inhibidores Serpins presentan una masa molecular entre 39 - 43 kDa. Son inhibidores irreversibles, suicidas, forman un complejo final Serpin- proteasa donde la proteasa permanece unida covalentemente al inhibidor, ocasionándole una distorsión severa en su conformación nativa. Estos cambios conducen a la distorsión del sitio activo de tal manera que el biocatalizador no puede llevar a cabo su función (Falfán, 2009; Habib, 2007). El tipo de inhibición que mostraron los extractos de *S. molle* fue reversible, incompetitiva y mixta según el caso, por lo cual se puede decir que no estamos en presencia de un inhibidor de tipo Serpin, dado que la tipificación es distinta. Según los reportes existentes, los inhibidores Kunitz presentan un tamaño molecular entre 18- 22kDa. Estos inhibidores son del tipo competitivo, lo cual no coincide en un principio con los estudios preliminares de tipificación llevados a cabo en los extractos de *S. molle*, los cuales presentaron una inhibición reversible, de tipo incompetitiva o mista,

según el caso. Por lo que resulta imprescindible continuar con estudios de purificación, donde se obtenga el o los inhibidores aislados para poder clasificar los mismos en base a su estructura, homología y mecanismo inhibitorio.

Según estudios anteriores *S. molle* es una planta que presenta actividad antifúngica y antimicrobiana principalmente en las hojas (Gundidza, 1993). Tiene importancia etnobotánica, pues se la ha utilizado en el control de plagas agrícolas en varias oportunidades, por ejemplo fue avaluado su efecto sobre la mortalidad larval de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*, *Trichogramma pintoij*, *Copidosoma koehleri*, *Chrysoperla externa* y *Sitophilus zeamais* (Iannacone, 2003; Silva, 2005). También fue evaluada la actividad insecticida de extractos de drupas de *Schinus molle* sobre larvas de *Cydia Pomonella* (Chirino, 2001). Estas propiedades no han sido adjudicadas a ninguna familia de compuestos químicos. Siguiendo los resultados obtenidos en el presente estudio, se podría pensar en los inhibidores de proteasas proteolíticas como los responsables de algunas de las estas propiedades presentadas por *S. molle*. En el caso de la reportada mortalidad en insectos, podría deberse específicamente a inhibidores de tripsina, lo cual provoca una disminución en la digestión en los animales patógenos, con sus concebidas consecuencias.

Bibliografía

Ásgeirsson B., Fox J.W. & Bjarnason J.B. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. J. Biochem. 180: 85-94 (1989).

Barrett A. J., Rawlings N. D. & Woessner J. F. Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press. London. (1998).

Bergmeyer H. U. Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press. New York. 1: 515-516 (1974).

Billings P.C., et al. A growth-regulated protease activity that is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA. 89: 3120–3124 (1992).

Birk Y. Plant Protease Inhibitors: Significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering. Springer Publishers, Berlin. 1 – 170 (2003).

Chaudhary N.S., Shee C., Islam A., Ahmad F., Yernool D., Kumar P. & Sharma A. K., Purification and characterization of trypsin inhibitors from *Putranjiva roxburghii* seeds. Phytochemistry. 69: 2120- 2126 (2008).

Chirino M., Cariac M. & Ferrero A.A. Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatales de *Cydia Pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) Bol. San. Veg. Plagas 27: 305- 314 (2001).

Cohen T. Gertler A. & Birk Y. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)- II. Kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastasa. Comp. Biochem. Physiol. 69B: 647- 653 (1981).

Correa Junior C., Cultivo de plantas medicinales, condimentares e aromáticas. EMATER-Paraná. 162 (1991).

De Wit H.C.D. Plants of the world: the higher plants. E.P. DUTTON & Co. INC., New York (1993).

De Leo F., Volpicella M., Licciulli F., Liuni S., Gallerani R. & Ceci L. R. Plant PIs: A database for plant protease inhibitors and their genes. Nucleic Acids Res. 30: 347- 348 (2002).

Díaz M.M. Proteasas digestivas de tipo Tripsina del Taladro del Maíz, *Sesamia nonagrioides* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): Caracterización e interacción con la proteína insecticida Cry1Ab. Tesis Doctoral (2006).

Fan S. G. & Wu G. J. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. Bot. Bull. Acad. Sin. 46: 273 – 292 (2005).

Fei Fang E., Ho Wong J., Shui Fern Bah C., Lin P., Wah Tsao S. & Bun Ng T. *Bauhinia variegata* var. *variegata* trypsin inhibitor: From isolation to potential medical applications. Biochem. & Biophysical res. Communications. 396: 806- 811 (2010).

Franco O.L., Santos R.C., Batista J.O.N, Mendes A.C.M., Araújo M.A.M., Moneratt R.G., Grossi- de- Sá M.F. & Freitas S.M., Effects of black- eyed pea trypsin/ chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. Phytochemistry. 63: 343- 349 (2003).

García P.P. & López. Evaluación de la absorción y metabolism intestinal. 22 (2): 5- 13 (2007).

Gundidza M. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. Cent. Afric. J. Med. 39: 231- 234 (1993).

Habib H. & Fazili K.M., Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. Biotechnology and Molecular Biology Review. 2 (3): 68- 85 (2007).

Heywood V.H. Flowering Plants of the World. Ed. Update Oxford University Press. New York. 197- 198 (1993).

Iannacone J. & Lamas G. Toxicological effects of Peruvian peppertree (*Schinus molle*) and lantana (*Lantana camara*) on *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), *Trichogramma pinto* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Capidosoma koehleri* (hymenoptera: Encyrtidae) in Peru. Agricultura Técnica. 63 (4) (2003).

Ivanov D., Emonet C., Foata F., Affolter M., Delly M., Fisseha M., BlumSperisen S., Kochhar S. & Arigoni F. A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase like serine proteases. J. Biol. Chem. 281 (25): 17246- 17252 (2006).

Joanitti G.A., Freitas S.M. & Silva L.P. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. Current Enzyme Inhibition. 2 (3): 199- 217 (2006).

Kennedy A.R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. Am Clin Nutr J. 68: 1406– 1412 (1998).

Laskowski M. et al. Protein inhibitors of proteinase. Ann. Rev.Biochem. 49: 593- 629 (1980).

Leatherbarrow R.J. Using linear and non- linear regression to fit biochemical data. Trends Biochem. Sci. 15 (12): 445- 448 (1990).

Liener I.E. & Kakade M.L. Protease inhibitors, Toxic Constituents of Plant Food Stuffs. (2nd Eds.) Academic Press, New York. 7- 71 (1980).

Lineweaver H. & Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. Journal of the American Chemical Society. 56 (3): 658-666 (1934).

Lingaraju M.H. & Gowda L.R. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfuro bridge. Biochimica et Biophysica Acta. (1784) 850- 855.

Marques D., Pessela B.C., Betancor L., Monti R., Carrascosa A.V., Rocha- Martin J. & Fernandez- Lorete G. Biotechnol Prog. 27 (3): 677-683 (2011).

Muller- Esterl W. Bioquímica: Fundamentos para medicina y Ciencias de la Vida. México. (2008).

Niu W., Chen Z., Gandhi P.S., Vogt A.D., Pozzi N., Pelc L.A., Zapata F. & Di Cera E. Crystallographic and kinetic evidence and allostery in a trypsin- like protease. Biochemistry. 50 (29): 6301- 6307 (2011).

Peretó J., Sendra R., Pamblanco M. & Bañó C. Fundamentos de Bioquímica. Universitat de Valencia, 97- 109 (2007).

Rawlings N.D., Tolle D.P. & Barrett A.J. MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acid Res. 32 Database issue: 160- 164 (2004a).

Rawlings N.D. et al. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378: 705-716 (2004b).

Ryan C. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 425- 449 (1990).

Silva G., Orrego O., Hepp R. & Tapia M. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* en maíz almacenado. *Pesq. Agropec. Bras.* 40 (1): 11- 17 (2005).

Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G. & Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of protein. *Protein Science.* 4: 2411- 2423 (1995).

Terra W.R. & Ferreira C. Biochemistry of digestión. *Comprehensive Molecular Insect. Science.* 4: 171- 224 (2005).

Tortorelli L.A. Maderas y bisques argentines. Ed. ACME S.A.C.I.P. 524- 525.

Uesugi Y., Usuki H., Arima J., Iwabuchi M. & Hatanaka T. Molecular dissection of *Streptomyces* trypsin on substrate recognition. *Biochim Biophys Acta.* 1814 (10): 1295-1304 (2011).

Vallés D.; Furtado, S. & Cantera, A.M.B. *Enzyme and Microbial Technology.* 40: 409-413 (2007).

Wano M. Evaluation of essential oils of some local plants for their repellency against *Anopheles arabiensis* y *Aedes aegypti*. Tesis de Maestría (2006).