

Universidad de la República- Facultad de  
Ciencias

---

Agentes antimicrobianos  
naturales: compuestos  
fenólicos y péptidos de la  
flora uruguaya

---

Manuscrito para la obtención del título de Magister en Ciencias  
Biológicas

Lic. Gabriela da Rosa

Dirección de tesis:  
Dra. Gianna Cecchetto  
Dra. Marcela Ibáñez

# Agradecimientos

---

A Gianna por todo el apoyo, tanto desde lo académico como desde lo personal, porque aún en esos momentos de desesperación me apoyó y me incitó a seguir adelante. Por la confianza y dedicación durante todo este tiempo y por ser mucho más que una tutora.

A Marcela también por su confianza y por darme la oportunidad (allá por el 2013) de volver a este mundo que tanto me gusta, la ciencia.

A Susana por ser la pionera del grupo en el tema de los péptidos, por contestar dudas, consultas, discutir resultados, protocolos. Por su calidez y sencillez y por las charlas y momentos compartidos.

A Álvaro por recibirme y darme una mano en el momento de mayor desesperación y ayudarme a ver la leve luz al final del camino.

A Pepe por estar siempre dispuesto a recibirme y enseñarme con paciencia y una sonrisa. Por tomarse el tiempo y porque fue una parte fundamental de los resultados expuestos en esta tesis.

A Seba por su buena onda, su disposición, enseñanzas y porque también gracias a él muchos de los resultados de esta tesis fueron posibles. Porque como colega es un genio pero además se ha vuelto un gran amigo.

A Agustín por estar siempre para responder dudas, prestarme materiales y ayudarme en todo lo que le fue posible sin importar el día o la hora.

A Pablo por la oportunidad y la confianza, por tomarse el tiempo más allá de sus miles de compromisos, por compartir y por permitirme crecer.

A Agus por todo... por bancarse el estrés, los días sentada delante de la compu sin prácticamente emitir palabra, los enojos, llantos, angustias y frustraciones. Por compartir también alegrías y logros. Porque además de mi pareja es mi consejero, confidente, revisor, colega pero principalmente por ser mi amor y compañero de vida.

A Mari también por todo... A nivel académico por ser una referente y un ejemplo en su forma de trabajar, por siempre estar dispuesta a enseñar compartir y discutir. A nivel personal por las charlas, los llantos, las risas y los buenos momentos compartidos en estos años... vamos por muchos más.

A los peones que hacen que el ir a trabajar sea una fiesta... que cada día en el labo sea un disfrute y porque ya son más que compañeros de trabajo... son amigos de la vida.

A las otras jefas del 12 MIS, MJP y Sonia por la buena onda, por siempre responder dudas tanto académicas como burocráticas y porque desde el comienzo me hicieron sentir parte del 12.

A Pia y a Sole porque siempre que fue necesario se amoldaron a mis viajes y cursos sin inconvenientes, por su sencillez y buena disposición y porque durante estos años hemos formado un gran equipo de trabajo.

A todos los integrantes del DEPBIO y especialmente al Área Microbiología por permitirme ser parte desde el comienzo, por la buena onda y por los momentos compartidos durante estos años.

A mi papá (mi libro gordo de petete) porque quizás sin quererlo o quizás queriéndolo un poco... es el responsable de mi amor por la ciencia y la naturaleza, porque me enseñó a buscar respuestas y generar fascinación por entender el mundo que me rodea. Porque sé que está ahí siempre.

A mi mamá porque siempre me motivó a hacer lo que me gusta y me enseñó a perseguir siempre lo que me haga feliz.

A todos los científicos, a los de ahora, a los de antaño, a los famosos y anónimos, a los un poco locos y a los un poco cuerdos...

# Resumen

---

Actualmente ha aumentado considerablemente la investigación en el desarrollo de agentes antimicrobianos naturales en áreas tan diversas como la salud, agricultura, industria alimentaria, preservación de materiales de construcción, etc. Este interés se debe al aumento de la resistencia de los microorganismos a las drogas o compuestos químicos convencionales y a los problemas a nivel ambiental que genera la producción y la aplicación de estos productos. Las plantas son una reserva importante de compuestos bioactivos con actividad farmacológica *per se* o como punto de partida para el desarrollo nuevas drogas. En el correr de la evolución han desarrollado mecanismos de defensa, constitutivos e inducidos, como barreras físicas y/o producción de compuestos insecticidas y/o antimicrobianos. Estos últimos pueden ser proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas PRs, *pathogenics released*) o metabolitos secundarios como fenoles y otros compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Dentro de las PRs se encuentran los AMPs: péptidos pequeños, producidos por un único gen que proporcionan una respuesta inmune relativamente rápida y de bajo costo energético que complementa al sistema inmune adaptativo. Los compuestos fenólicos se forman por vías multienzimáticas, se localizan en casi todos los tejidos (hoja, frutos, semillas, raíces, madera y corteza) y juegan un rol probablemente antioxidante y fungicida. Además la capacidad de formar complejos estables con polímeros estructurales los vincula con la durabilidad natural de la madera de algunas plantas leñosas.

En este trabajo se caracterizan AMPs y compuestos fenólicos en función de la actividad antimicrobiana. En el Capítulo 2 se analizan y verifican posibles defensinas, secuencias obtenidas de transcriptomas de semillas germinadas de las plantas nativas *Maytenus ilicifolia* (congorosa) y *Peltophorum dubium* (ibirapitá). Uno de los péptidos verificados fue producido heterológamente en *E.coli* analizando su actividad contra microorganismos patógenos vegetales y humanos. En el capítulo 3 se analiza la actividad de compuestos fenólicos, extraídos químicamente de madera de la especie *Gleditsia triacanthos L.*, contra hongos xilófagos para determinar su potencialidad como componentes principales de mezclas preservantes de madera, de origen natural.

# Contenido

---

<b>Contenido</b> .....	1
<b>Lista de figuras</b> .....	5
<b>Lista de tablas</b> .....	7

## **Capítulo 1: Introducción**

1.1 Péptidos antimicrobianos.....	13
1.1.1. Antecedentes y generalidades.....	13
1.1.2. Defensinas.....	16
1.1.3. Actividad antimicrobiana de AMPs.....	19
1.1.4. Producción de AMPs para su uso en agricultura, medicina e industria.....	25
1.1.5. Producción heteróloga.....	28
1.2 Compuestos fenólicos.....	34
1.2.1. Preservantes naturales de madera.....	34
1.2.2. Clasificación de compuestos fenólicos.....	37
1.2.3. Mecanismos de acción.....	44
1.2.4. Métodos de extracción y análisis.....	47
<b>Objetivos</b> .....	50

## **Capítulo 2: Resultados AMPs**

2.1 Defensinas de ibirapitá y congorosa.....	53
2.1.1. Verificación de secuencias transcriptómicas de <i>Maitenus ilicifolia</i> (congorosa).....	54
2.1.2. Verificación de secuencias transcriptómicas de <i>Peltophorum dubium</i> (ibirapitá).....	63
2.1.3. Análisis global de secuencias.....	68
2.2 Análisis del péptido MiDf6861 de congorosa.....	72
2.2.1. Subclonado de <i>midf6</i> en vectores de expresión.....	74
2.2.1.a Subclonado en vector pET102D.....	75
2.2.1.b Subclonado en vector pET32c.....	76

2.2.2 Evaluación de las condiciones de expresión.....	77
2.2.3. Solubilización de las proteínas recombinantes.....	79
2.2.4. Clivado y purificación de MiDf6-HisTag.....	81
2.2.5. Purificación de MiDf6p32.....	84
2.2.6. Cuantificación de péptidos purificados.....	86
2.3 Ensayos de actividad antimicrobiana.....	87
2.3.1 Actividad antifúngica del péptido MiDf6.....	87
2.3.2 Ensayos preliminares de <i>screening</i> por actividad.....	88
2.3.2.a. Ensayos de doble capa en medio sólido.....	90
2.3.2.b. Ensayo en medio líquido.....	92
2.3.3. Análisis y discusión de los métodos de <i>screening</i> .....	94

### Capítulo 3: Resultados compuestos fenólicos

3.1 Extracción química de compuestos fenólicos.....	98
3.2 .Selección de extractos en función de la actividad contra hongos xilófagos.....	100
3.2.1 Fraccionamiento de extractos seleccionados.....	103
3.2.2 Visualización del efecto antimicrobiano.....	106
3.3 Análisis estadístico.....	107
3.4 MALDI-TOF.....	109

### Capítulo 4: Conclusiones y perspectivas

4.1Defensinas.....	116
4.2 Compuestos fenólicos .....	119

### Capítulo 5: Materiales y métodos

M1. Cepas, plásmidos y <i>primers</i> .....	122
M2. Medios de cultivo.....	123
M3. Métodos	
M3.1_Análisis de contigs obtenidos por ARNseq.....	127
M3.2_ Técnicas empleadas con ADN.....	128
M3.2.1 Extracción de ADNg de planta.....	128

M3.2.2 Amplificación por PCR convencional .....	128
M3.2.3 Clonado en vector T.....	129
M3.2.4 Precipitación de los productos de ligación con ARN-t.....	129
M3.2.5 Transformación de células de <i>E. coli</i> mediante electroporación.....	129
M3.2.6 Subclonado <i>pET102D</i> por <i>Restriction-Free cloning</i> PCR.....	130
M3.2.6.a Primera PCR (producción de “megaprimer”).....	130
M3.2.6 .b Clonado en vector de expresión (segunda PCR RF-cloning).....	130
M3.2.7 Subclonado en vector de expresión <i>pET32c</i> por <i>Transfer-PCR</i> .....	130
M3.2.8 Digestión con enzima <i>DpnI</i> .....	131
M3.2.9 Extracción de ADN plasmídico.....	131
M3.2.10 Electroforesis de ADN.....	132
M3.2.11 Preparación de células electrocompetentes.....	132
M3.3 Técnicas empleadas con proteínas	
M3.3.1 Producción de proteína recombinante (ensayo piloto).....	133
M3.3.2 Producción de proteína recombinante.....	133
M3.3.3 Tratamiento con tritón.....	134
M3.3.4 Solubilización en urea.....	134
M3.3.5 Purificación por cromatografía de afinidad (IMAC-Ni <sup>2+</sup> ).....	135
M3.3.5 a Preparación de la matriz.....	135
M3.3.5 b <i>Refolding</i> en columna de proteínas solubilizadas y purificación.....	135
M3.3.6 Digestión del péptido recombinante con enteroquinasa (EK) en columna.....	136
M3.3.7 Eliminación del imidazol por diálisis.....	136
M3.3.8 Electroforesis de proteínas.....	136
M3.3.8 Preparación del gel acrilamida/bisacrilamida 15 % (3 minigeles de 10 x 8 x 0.75, 1, 1.5 cm).....	137
M3.3.9 Cuantificación por Bradford.....	138
M3.3.10 Análisis de por MALDI TOF de proteínas.....	138

M3.4 Técnicas empleadas con compuestos fenólicos	
M3.4.1 Extracciones.....	139
M3.4.1.a Extracciones con solventes orgánicos.....	139
M3.4.1.b Extracciones acuosas.....	139
M3.4.2 Medidas espectrofotométricas.....	140
M3.4.2.a .Fenoles totales.....	140
M3.4.2.b Taninos condensados.....	140
M3.4.2.c Taninos hidrolizables .....	140
M3.4.2.d Flavonoides.....	141
M3.4.3 Extracción con deitíl-éter (segunda tanda).....	141
M3.4.4 Análisis por MALDI –TOF.....	141
M3.4.5 Cálculo de incertidumbre.....	142
M3.4.6 Análisis exploratorio de datos .....	143
M3.5 Ensayos de actividad antimicrobiana	
M3.5.1 Preparación de inóculos.....	143
M3.5.1.a Suspensión de esporas.....	143
M3.5.1.b Suspensión de células bacterianas.....	144
M3.5.2 Ensayo de concentración inhibitoria mínima .....	144
M3.5.3 Estandarización de concentraciones de fungicidas usados como control .....	145
M3.5.5 Observación al microscopio y reislamiento.....	145
M3.5.6 Ensayo de doble capa en medio sólido.....	145
M3.5.6.a Ensayo piloto de inducción en placa.....	145
M3.5.6.b Método de <i>screening</i> de doble capa.....	146
M3.5.7 Método de <i>screening</i> en medio líquido.....	147
<b>Bibliografía.....</b>	<b>148</b>
<b>Anexo1. Figuar A1</b> Gráficos y parámetros obtenidos en el análisis del péptido señal (SignalP 4.1) para los <i>contigs</i> de congorosa .....	155
<b>Anexo2. Figura A2.</b> Gráficos y parámetros obtenidos en el análisis del péptido señal (SignalP 4.1) para los <i>contigs</i> de ibirapita.....	156

<b>Anexo3. Figura A3.</b> Mapa de <i>contig</i> PdDN11865 de ibirapit'a.....	157
<b>Anexo4. Tabla A4.</b> Información de defensinas utilizadas en el análisis filogenético obtenidas de bases de datos PDB (Protein Data Bank) y UniProtKB.....	158
<b>Anexo5. Tabla A5.</b> Resumen de resultados obtenidos para todas las muestras analizadas: medidas espectrofotométricas y concentraciones inhibitorias mínimas (CIM).....	160

## Lista de figuras

Figura 1.1-1. Clasificación de AMPs caracterizados según el reino del que fueron aislados.....	14
Figura 1.1-2. Representación estructural de AMPs.....	15
Figura 1.1-3. Alineamiento de secuencias peptídicas de defensinas de plantas.....	18
Figura 1.1-4. Estructura tridimensional de defensinas.....	19
Figura 1.1-5. Esquema para explicar selectividad celular de AMPs.....	20
Figura 1.1-6. Mecanismos de acción propuestos para AMPs.....	21
Figura 1.1-7. Representación de posibles mecanismos de acción de los AMPs.....	24
Figura 1.1-8. Ejemplos de actividades biológicas y modos de acción demostrados para algunas defensinas de plantas.....	26
Figura 1.1-9. Principales características de los sistemas organismos/Vectores utilizados en la producción de AMPs.....	29
Figura 1.1-10. Esquema de interacción entre los residuos de histidina de la proteína y el Níquel coordinado con NTA.....	32
Figura 1.1-11. Compatibilidad y limitaciones en la purificación de proteínas con motivos HisTag de las resinas de Ni-NTA con agentes químicos comúnmente usados.....	33
Figura 1.1-12. Proteasas más comúnmente usadas para el clivaje de proteínas de fusión.....	34
Figura 1.2-1. Estructura macroscópica de un leño.....	37
Figura 1.2-2 Principales vías de formación de compuestos fenólicos.....	38
Figura 1.2-3. Estructura básica de flavonoides.....	39
Figura 1.2-4. Clasificación de taninos.....	41
Figura 1.2-5. Esquema de biosíntesis de taninos hidrolizables.....	42
Figura 1.2-6. Diferentes estructuras de taninos condensados.....	43
Figura 2.1-1. Electroforesis de productos de amplificación de ADN <sub>g</sub> de Congorosa con <i>primers</i> en UTR 5' y 3'.....	56
Figura 2.1-2. Mapa del gen MiDN6861.....	57
Figura 2.1-3. Modelo del <i>contig</i> MiDf6861 generado por homología con 2LR3 en Raptor X, visualización VMD 1.9.3. ....	58

Figura 2.1-4. Mapa de secuencias MiDN37676 124/c2,123/c1 y 121.....	59
Figura 2.1-5 Secciones de cromatograma del amplicón de los <i>contigs</i> MiND37676.....	61
Figura 2.1-6. Mapa de <i>contigs</i> de congrosa comparados mediante alineamiento de las secuencias nucleotídicas y peptídicas.....	62
Figura 2.1-7. Modelos por homología con 4UJO de <i>contigs</i> de congrosa con 10 Cys, generados en Raptor X, visualización VMD 1.9.3.....	63
Figura 2.1-8. Electroforesis de productos de amplificación de ADN <sub>g</sub> de Ibirapitá.....	65
Figura 2.1-9. Secuencia <i>contigs</i> MiDN24034.....	66
Figura 2.1-10. Mapa de los genes de ibirapitá .....	67
Figura 2.1-11. Esquema de la estructura de genes verificados.....	68
Figura 2.1-12. Árbol filogenético y alineamiento de <i>contigs</i> y defensinas de bases de datos.....	71
Figura 2.2-1. Esquema de proteínas de fusión producidas.....	72
Figura 2.2-2. Esquema de metodologías de clonado.....	74
Figura 2.2-3. Primera reacción de amplificación de RF- <i>clonig</i> .....	75
Figura 2.2-4 Verificación de inserto en pET32.....	76
Figura 2.2-5. Visualización de inducción en cultivo líquido.....	78
Figura 2.2-6. Producción de proteínas recombinantes en células <i>E.coli</i> RG transformadas con vectores derivados de pET102D.....	78
Figura 2.2-7. Solubilización de proteína con urea.....	79
Figura 2.2-8. <i>Refolding</i> con gradiente de urea.....	80
Figura 2.2-9 Evaluación de clivado en columna de Trx*.....	81
Figura 2.2-10 Clivado de Trx-MiDf6-Histag.....	83
Figura 2.2.11 Mapeo peptídico MS-MS.....	84
Figura 2.2-12 Purificación de MiDf6p32.....	85
Figura 2.3-1 Ensayo de MIC contra <i>A.niger</i> .....	88
Figura 2.3-2 Inhibición del crecimiento en ensayo de doble capa.....	91
Figura 2.3-3 Ensayo de actividad en medio líquido.....	93
Figura 3.1-1. Curvas de calibración para taninos hidrolizables y fenoles totales.....	98

Figura 3.2-1. Ensayo de MIC con algunos extractos enfrentados a <i>P. atropurpurascens</i> luego de 5 días de incubación.....	101
Figura 3.2-2. Curva de calibración con rutina para la determinación de flavonoides por absorbancia a 434 nm .....	104
Figura 3.2-3. Imágenes obtenidas en microscopio óptico de ensayos de determinación de MIC (40X).....	106
Figura 3.4-1 Comparación de la forma y picos obtenidos en los espectros de masa.....	110
Figura 3.4-2. Zona del espectro de masa con valores m/z similares en las cuatro muestras.....	111
Figura 3.4-3. Zona del espectro de masa donde se observan diferencias entre los valores de m/z de las muestras de corteza con respecto a duramen.....	112
Figura 3.4-4 Fracción del espectro de masa de la muestra DI6Et.....	113
Figura 3.4-5 Estructuras de taninos hidrolizables que podrían estar presentes en las muestras.....	114
Figura 3.4-6. Estructuras de los monómeros que podrían estar condensados en las muestras.....	114

## Lista de tablas.

Tabla 2.1-1. Resultados del análisis por Blastp de péptidos deducidos de los <i>contigs</i> de congrosa con motivo defensina. Bases de datos SwissProt-UniProt.....	51
Tabla 2.1-2. Resultados del análisis por Blastp de péptidos deducidos de los <i>contigs</i> de ibirapitá con motivo defensina.....	64
Tabla 2.2-1. Valores de peso molecular y punto isoelectrico de las moléculas recombinantes analizadas en este trabajo.....	73
Tabla 3.2-1 Concentraciones de compuestos y valores de Concentración inhibitoria Mínima (CIM) de las 8 muestras que presentaron actividad contra los cuatro hongos ensayados .....	102
Tabla 3.2-2 Valores de MIC (mg/ml) antes (A/F) y después de fraccionamiento (F) con dietil-éter para los extractos enfrentados a los cuatro hongos analizados.....	105
Tabla 3.3-1. Contenido de fenoles totales (FT), taninos hidrolizables (TH), taninos condensados (TC) y flavonoides (Fl) en las muestras seleccionadas en función de la	

actividad antimicrobiana contra los hongos luego de fraccionamiento con dietil-éter.....	108
Tabla M.1. Cepas transformadas.....	124
Tabla M.2. Plásmidos .....	124
Tabla M.3. <i>Primers</i> .....	125

# Capítulo 1

## Introducción

---

Históricamente la naturaleza ha sido fuente de inspiración para el desarrollo de productos de diversos usos. En la actualidad, tanto desde la industria como desde la academia, la búsqueda y el desarrollo de procesos y productos amigables con el medio ambiente es cada vez más importante. El uso de agroquímicos, muchos de ellos perjudiciales para el ambiente y la salud de productores y consumidores, está siendo cuestionado desde diversos ámbitos sociales. En este sentido, a nivel mundial ha aumentado considerablemente la investigación en el desarrollo de agentes antimicrobianos naturales en áreas tan diversas como la salud, agricultura, industria alimentaria, preservación de materiales para la construcción, etc. La demanda de productos “más verdes” para el manejo de plagas ha llevado al incremento del desarrollo de nuevos bioplaguicidas (Cantrell *et al.*, 2012). Este interés se debe no solo a los problemas a nivel ambiental que genera la producción y la aplicación de estos productos sino al aumento de la resistencia de los microorganismos a las drogas o compuestos químicos convencionales (revisión Hayek *et al.*, 2013).

Particularmente las plantas han demostrado, desde tiempos remotos, ser una reserva importante de compuestos bioactivos con actividad farmacológica *per se* o han sido fuente de descubrimiento de nuevas moléculas para el desarrollo de drogas (Gurib-Fakim, 2006). En el correr de la evolución han desarrollado mecanismos de defensa constitutivos e inducidos que les permiten afrontar el ataque de depredadores de diversos tipos: herbívoros, hongos, insectos, bacterias, protozoos o virus. Estos mecanismos incluyen barreras físicas como tejidos epidérmicos quitinizados y lignificados y/o la producción de compuestos antimicrobianos. Estos últimos pueden ser proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas PRs, pathogenics released) o metabolitos secundarios como fenoles y otros compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Tanto la capacidad de producir proteínas PRs como de sintetizar compuestos fenólicos son tempranas en la evolución y les habría conferido a algunas plantas una ventaja adaptativa por su acción contra patógenos y depredadores (Scalbert, 1992; Zasloff, 2002).

Las proteínas PRs han sido clasificadas en 17 familias diferentes. La mayoría son inducidas por compuestos de señalización como el ácido salicílico, ácido jasmónico o etileno, y poseen efecto antimicrobiano *in vitro* a través de actividades líticas en las paredes celulares, toxicidad de contacto y desarrollo de señalización defensiva (Sels

*et al.*, 2008). Entre las familias de PRs, tres de ellas codifican para pequeños péptidos antimicrobianos ricos en cisteínas (AMPs, *antimicrobial peptides*). Los AMPs junto a demás efectores de la respuesta innata, constituyen el principal mecanismo de defensa durante las etapas iniciales de una infección. Son péptidos pequeños que son producidos por un único gen y proporcionan una respuesta inmune relativamente rápida y con un costo energético bajo que complementa al sistema inmune adaptativo de todos los vertebrados superiores (Bowdish *et al.*, 2005; revisión Brown y Hancock, 2006).

Los compuestos fenólicos se forman por vías multienzimáticas, se localizan en casi todos los tejidos (hoja, frutos, semillas, raíces, madera y corteza) de un gran número de plantas tanto leñosas como herbáceas y juegan un rol probablemente antioxidante y fungicida (Vek *et al.*, 2013). La capacidad de formar complejos estables con polímeros estructurales celulosa, hemicelulosa y lignina, los vincula con la durabilidad natural de la madera de algunas plantas leñosas (Kirker *et al.*, 2013).

En este trabajo se busca caracterizar compuestos naturales en función de la actividad antimicrobiana. Los Resultados se organizan en dos capítulos, uno relativo a AMPs y el otro a compuestos fenólicos. En el capítulo 2 se muestra el análisis y verificación biológica de posibles defensinas obtenidas del ensamblado del transcriptoma de semillas germinadas de las plantas nativas *Maytenus ilicifolia* (conogorosa) y *Peltophorum dubium* (ibirapitá). Uno de los péptidos verificados fue producido en *E.coli* y se caracterizó en función de su actividad. En el capítulo 3 se describe un estudio de la actividad de compuestos fenólicos, extraídos de madera de la especie *Gleditsia triacanthos L.*, categorizada como “especie invasora de amplia distribución e impacto adverso” (Nebel y Porcile, 2006), contra hongos xilófagos para determinar su potencialidad como componentes de mezclas preservantes de madera, de origen natural y bajo impacto ambiental.

## 1.1. Péptidos antimicrobianos (AMPs)

### 1.2. 1.1.1. Antecedentes y generalidades

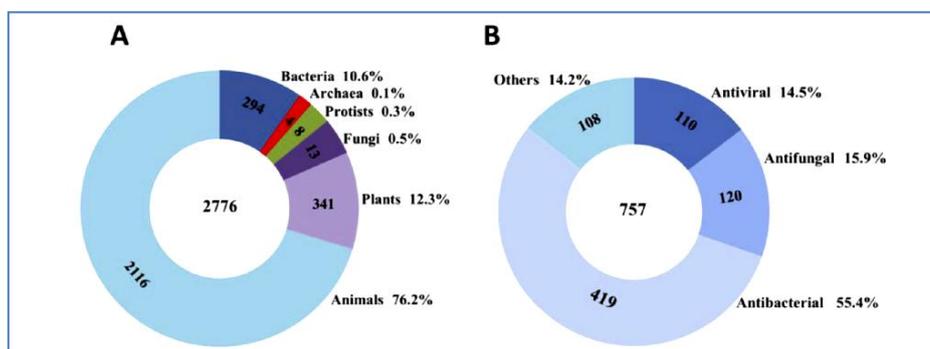
A partir de la descripción, en 1968, del primer AMP del insecto *Manduca sexta* (Dunn, 1968), el estudio de estas moléculas ha aumentado considerablemente por su demostrada actividad contra un amplio rango de organismos: bacterias, hongos, virus y protozoarios.

En plantas los AMPs se producen principalmente de forma constitutiva en zonas que están en contacto con el ambiente exterior como órganos de almacenamiento (semillas) y células periféricas de tejidos generativos (órganos reproductivos, frutas y flores), aunque también pueden ser inducidos luego de una infección en estos y otros tejidos. Numerosos estudios han demostrado que una única interacción entre la planta y el patógeno es capaz de reclutar o silenciar cientos de genes relacionados con la expresión de estas moléculas (revisión Carvalho y Gomes, 2009; revisión Benko Iseppon *et al.*, 2010). La acumulación de agentes antimicrobianos puede ser local, es decir en el lugar donde se produce el ataque, o en una zona distante donde todavía no se ha producido infección. Este fenómeno es conocido como sistema de inducción de resistencia (*induced systemic resistance*, ISR) o sistema de resistencia adquirida (*systemic acquired resistance*, SAR) y juega un rol fundamental contra el ataque de patógenos (Durrant y Dong, 2004). No sólo presentan actividad contra patógenos de plantas, sino también contra patógenos de humanos, por lo que están siendo considerados para la producción de nuevos fármacos y agentes terapéuticos (revisión Mahlapuu *et al.*, 2016).

La mayoría se producen como precursores inactivos más grandes con un péptido señal N-terminal como señal de secreción que luego es clivado (Bals, 2000). Las modificaciones post-traduccionales incluyen, en algunos casos, glicosilación, amidación carboxi-terminal, isomerización de aminoácidos, y halogenación (Zaslhoff, 2002; revisión Benko Iseppon *et al.*, 2010). El péptido maduro es una molécula de entre 10 y 50 aminoácidos (peso molecular menor a 10 KDa), con carga neta positiva que va desde +2 a +11 debido a un exceso de residuos arginina y lisina, una

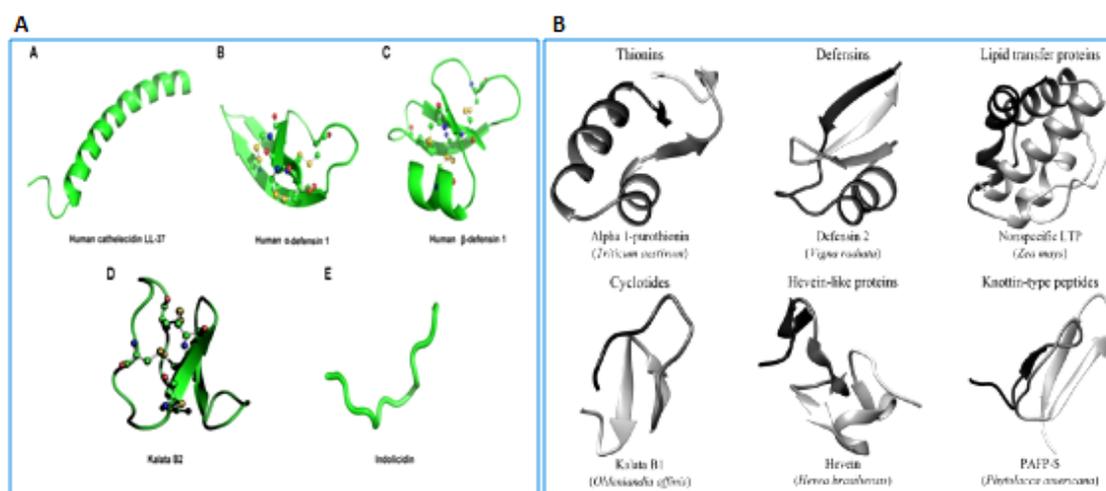
proporción de aproximadamente 50% de residuos hidrofóbicos y generalmente un número par de residuos de cisteínas conservados (Yeaman y Yount, 2003; Pasupuleti *et al.*, 2012). En solución adoptan estructuras compactas organizadas espacialmente de manera anfipática que les permite tolerar niveles de pH ácidos, solvente orgánicos y poseer alta estabilidad térmica (Yeaman y Yount, 2003; Brogden, 2005). La tendencia a formar este tipo de estructuras facilita además, su interacción e inserción en las paredes celulares y membranas de fosfolípidos aniónicos de los microorganismos que es fundamental para su actividad (revisión Mahlapuu *et al.*, 2016).

La clasificación de los AMPs en función de la fuente (de plantas, animales, bacterias, insectos, hongos, etc.), actividad biológica (antibacteriano, antifúngico, antiviral, insecticida, antiparasitario, etc.), o propiedades fisicoquímicas (carga, hidrofobicidad, etc.), es muy difícil debido a la cantidad y diversidad de moléculas que existen. Algunas bases de datos poseen información con respecto a secuencia, estructura y blancos de acción: APD (*Antimicrobial Peptide Database* <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) y CAMP (*Collection of Antimicrobial Peptide*, <http://www.camp.bicnirrh.res.in/>). La primera contiene más de 2700 secuencias aisladas de una amplia gama de organismos, siendo la mayoría de mamíferos. La segunda contiene además información sobre la estructura tridimensional, dilucidada por RMN o difracción por rayos X, de 757 péptidos, la mitad de los cuales son péptidos antibacterianos (Figura 1.1-1, revisión Deng *et al.*, 2017).



**Figura 1.1-1. Clasificación de AMPs caracterizados según el reino del que fueron aislados. A)** AMPs depositados en la base de datos APD; **B)** AMPs depositados en la base de datos CAMP con estructura tridimensional dilucidada. Extraída de Deng *et al.*, 2017

Esta información permite predecir, por homología de la secuencia primaria, la estructura secundaria que está relacionada con la disposición y conectividad de residuos de cisteína. Los miembros de una misma familia muestran generalmente un patrón de plegado globalmente comparable, por lo tanto el modelo a partir de la secuencia permite su asignación a un grupo. De hecho la clasificación de AMPs más usada es por su estructura (revisión Wang *et al.*, 2015). La adopción de la estructura tridimensional implica la formación de hojas beta, alfa hélices, mezcla de ambas, resultando en estructuras cíclicas o extendidas que se estabilizan por puentes disulfuro intramoleculares (Figura 1.1-2a; revisión Silva *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015). En plantas los tipos de AMPs se clasifican en: defensinas, esnaquinas tioninas, proteínas de transferencia de lípidos, proteínas similares a heveína, y ciclótidos (Figura 1.1-2b, revisión Benko Iseppon *et al.*, 2010; Nawrot *et al.*, 2013; revisión Mahlapuu *et al.*, 2016).



**Figura 1.1-2. A) Representación estructural de AMPs.** (A) Péptidos  $\alpha$ -hélice; (B) péptidos hojas  $\beta$ ; (C) mezcla de estructuras de  $\alpha$ -hélices / hojas  $\beta$ ; (D) péptidos cíclicos y (E) hélices extendidas. Los enlaces disulfuro están representados en barras y esferas. Extraída de Silva *et al.*, 2011. **B) Estructura tridimensional de diferentes familias.** Obtenidas de RCSB Protein Databank. Extraída de Nawrot *et al.*, 2013

### 1.1.2. Defensinas

Entre los AMPs vegetales descritos hasta hoy, los principales componentes del sistema inmune innato de plantas son las defensinas. Parecen ser los únicos conservados entre organismos tan distintos como plantas, invertebrados y vertebrados, constituyendo una superfamilia de proteínas (Thomma *et al.*, 2002; Oard y Karki, 2006). Esta amplia distribución sugiere que la producción de estos péptidos como mecanismo de defensa es temprana en la evolución.

La mayoría de las defensinas conocidas han sido aisladas de semillas, sin embargo estudios de co-localización de proteínas y de expresión génica muestran que pueden encontrarse en todos los órganos, incluyendo frutas, flores, polen, hojas, cotiledones, raíces, tubérculos (revisión Carvalho y Gomes, 2009). Se encuentran principalmente en capas de la periferia, lo cual es consistente con un papel en la primera línea de defensa. Se han observado en paredes de la superficie de esporofitos de rábano, en capas de células periféricas de los órganos de la flor del tabaco y de células epidérmicas y hojas de primordios de tubérculos de papa (Broekaert *et al.*, 1995). También, en células de estomas y en las paredes de las células que recubren las cavidades subestomáticas de hojas de remolacha (Kragh *et al.*, 1995), indicando su importancia como agentes de defensa ya que los estomas son bien conocidos como puntos de entrada para patógenos (revisión Thomma *et al.*, 2001).

La familia génica que codifica estos péptidos ha evolucionado a través de sucesivas rondas de duplicación, solamente en el genoma de *Arabidopsis thaliana* se detectaron más de 300 genes de tipo defensina (Silverstein *et al.*, 2005). La estructura de los genes, generalmente presenta un intrón y dos exones, el primero formado mayoritariamente por la secuencia de un péptido señal y el segundo el dominio principal del péptido. El transcripto codifica un péptido pequeño, formado por un pro-péptido con cuya secuencia señal media la secreción y cuyo péptido maduro es el responsable de la actividad. El péptido señal es ácido en la mayoría de los casos y, además de ser necesario para la señalización, tiene la función de mitigar la actividad de la molécula madura.

Las defensinas vegetales se dividen según la estructura del pro-péptido en dos clases: de clase I y de clase II, cuyo péptido señal tiene una secuencia extra C-terminal de 27-33 aminoácidos. Las de clase I tienden a acumularse en paredes y espacios extracelulares (Gao *et al.*, 2000; de Beer y Vivier, 2008), mientras que en las de clase II, la secuencia C-terminal extra es una señal de almacenamiento en vacuolas donde se acumulan para ser liberadas cuando se produce el ataque de patógenos. Estas últimas fueron encontradas principalmente en solanáceas (Lay *et al.*, 2012).

El péptido maduro es catiónico y oscila entre 45 a 54 aminoácidos de longitud, con masas moleculares entre 5 y 7 KDa y valores de pI (punto isoeléctrico) de alrededor de 9,0. Generalmente contiene un número par de residuos de cisteínas (la mayoría 8) aunque se han identificado defensinas con estructuras alternativas que pueden llegar a duplicar la cantidad de cisteínas (revisión Carvalho y Gomes, 2009; revisión De Coninck *et al.*, 2013). A partir del análisis del transcriptoma de semillas de *Leymus arenarius* por ejemplo, Slavokhotova y colaboradores (2015) describieron secuencias, que no habían sido reportados hasta el momento, con motivos de entre 6 y 17 cisteínas separadas por cantidades variables de residuos. En los análisis de alineamientos de defensinas de plantas se observó que solamente las cisteínas son estrictamente conservadas y la homología en el resto de la secuencia es muy baja, aunque existen otros residuos comunes en muchas de ellas como glicinas y un glutamato en posiciones específicas que contribuyen al plegamiento (Figura 1.1-3; Song *et al.*, 2011; revisión Lacerda *et al.*, 2014, Shafee *et al.*, 2016, Ermakova *et al.*, 2016). Esta variabilidad estaría relacionada con la diversidad de microorganismos blanco y de mecanismos de acción (de Beer y Vivier, 2011; van der Weerden *et al.*, 2013).

Las estructuras terciarias reportadas en bases de datos son hasta la fecha, todas con motivos de 8 Cys, excepto la defensina PhD1 aislada *Petunia hybrida* que presenta 10, están definidas por la presencia de una hélice alfa y tres hojas beta antiparalelas estabilizadas por los cuatro puentes disulfuro que conllevan a una conformación pseudo cíclica acercando el extremo amino y carboxilo terminal. En esta conformación existen dos motivos estructurales bien definidos, el motivo “estabilizado por cisteínas” (CS $\alpha\beta$ , *Cystein Stabilized  $\alpha\beta$* ) entre la alfa hélice y la hoja

beta 1; y el  $\gamma$ -core formado por las hojas beta 2 y 3 que se unen por un *loop* (de Oliveira Dias y Franco, 2015). En el caso de Phd1 el quinto puente disulfuro se forma entre la Cys 2 y 5 que conectan la alfa hélice y el loop 1 compactando aún más la estructura (Janssen *et al.*, 2003). La estructura terciaria CS $\alpha\beta$  ha sido observada en defensinas de plantas, insectos, moluscos y hongos pero no en mamíferos que generalmente no tienen alfa hélices o se localizan en el extremo N-terminal (Figura 1.1-4; revisión Parisi *et al.*, 2018). El motivo  $\gamma$ -core es común a la mayoría de los AMPs (revisión Kaur *et al.*, 2011).

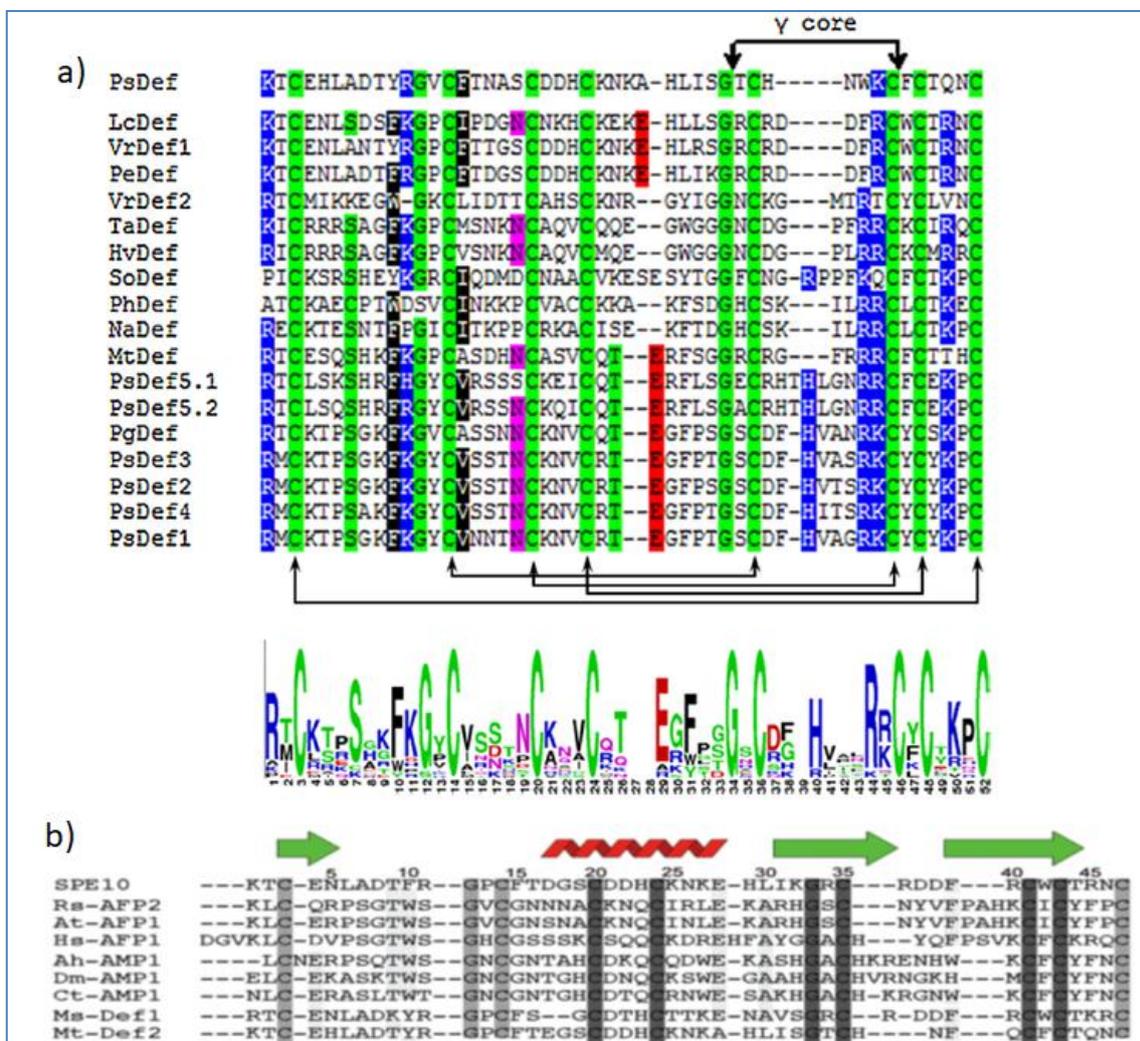
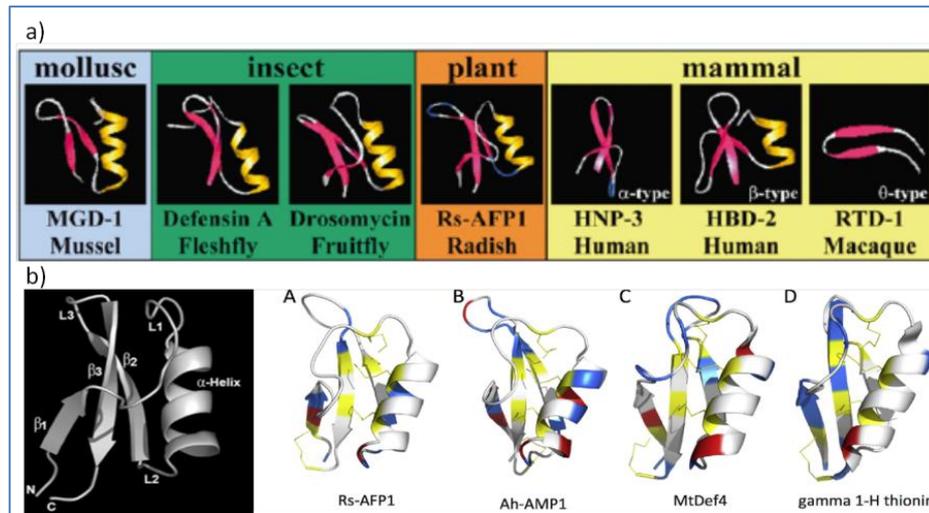


Figura 1.1-3. Alineamiento de secuencias peptídicas de defensinas de plantas a) Alineamiento de 18 secuencias donde se indican los residuos conservados, los 8 cisteínas, glicinas y un glutamato (abajo), los enlaces disulfuro se indican con flechas y se marca el motivo  $\gamma$ -core. Extraída de Ermakova *et al.*, 2016. b) Alineamiento de 9 defensinas donde se indica la predicción de estructura secundaria conservada. Extraída de Song *et al.*, 2011.



**Figura 1.1-4. Estructura tridimensional de defensinas.** a) Estructura de defensinas de moluscos, insectos, plantas y mamíferos. Extraída de Thomma *et al.*, 2002. b) Defensinas de plantas. Izquierda: se señalan los motivos  $\alpha$  hélice, hojas  $\beta$ , L1, L2 y L3 corresponden a *loops*, N y C extremos amino y carboxilo terminal respectivamente. Derecha: ejemplos con motivos típicos conservados: A) Rs-AFP1 de *Raphanus sativus*. B) Ah-AMP1 de *Aesculus hippocastanum*. C) MtDef4 de *Medicago truncatula*. D) gamma 1-H thionin de *Hordeum vulgare*. Extraída de Dias y Franco 2015. Las estructuras se obtuvieron de RSBC PDB data bank.

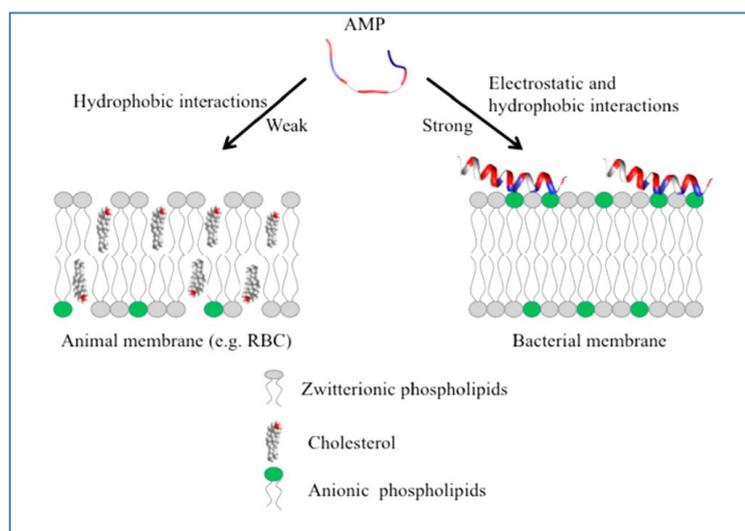
Se ha observado además, que algunas defensinas pueden formar oligómeros. Estudios cristalográficos han demostrado que defensinas como SPE10 de *Pachyrrhizus erosu* (Song *et al.*, 2011), NaD1 de *Nicotiana alata* (Lay *et al.*, 2012) y PsDef1 de *Pinus sylvestris* (Khairutdinov *et al.*, 2017) se encuentran formando dímeros en solución y que esta dimerización potencia su actividad probablemente por el aumento de la superficie cargada positivamente que le permite interactuar con las membranas y paredes celulares de microorganismos.

### 1.1.3. Actividad antimicrobiana de AMPs

La actividad antimicrobiana de los AMPs es generalmente rápida y directa por lo que son altamente efectivos en las primeras etapas de la infección o ataque (Hancock y Sahl, 2006). Esta actividad es diversa y difícil de predecir en función de la secuencia o estructura tridimensional ya que se ha observado que péptidos con estructuras muy similares tienen actividades contra microorganismos diferentes. Los mecanismos de acción han sido motivo de estudio desde que fueron descubiertos, siendo el más reportado el de disrupción de las membranas plasmáticas aunque cada vez hay más evidencia de la existencia de blancos intracelulares. Las

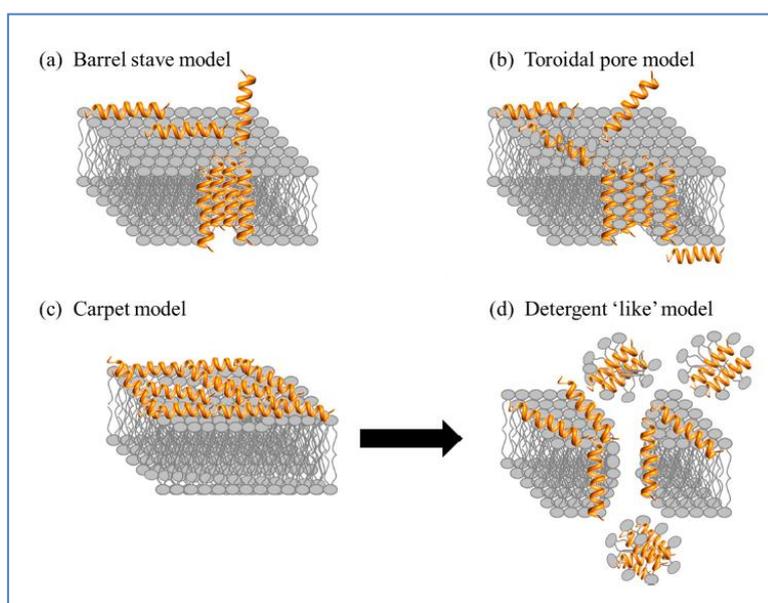
interacciones AMP-membrana permiten que los péptidos se acumulen y ensamblen en la superficie de la célula blanco hasta llegar a una concentración umbral. En este punto entonces puede darse una traslocación al interior celular o una desestabilización de la estructura de la membrana.

El fenómeno de interacción con membranas parece ser inespecífico, mediado por interacciones electrostáticas entre la molécula peptídica catiónica y las superficies exteriores de los microorganismos cargadas negativamente por la presencia de lipopolisacáridos y ácidos teicoicos cuyas cabezas negativas se orientan hacia el exterior. Las membranas de plantas y animales sin embargo, se componen principalmente de lípidos switeriónicos como esfingomiolina y componentes neutros como colesterol; la mayoría de los lípidos con grupos con carga negativa se localizan hacia el interior citoplasmático. Esta diferencia estructural permite discriminarlas y es utilizado como un primer blanco de señalización (Figura 1.1-5; Zasloff, 2002). Se ha reportado además que la actividad anticancerígena de algunos AMPs podría relacionarse con esta disposición de cargas ya que en las células tumorales la asimetría entre membrana externa e interna se pierde y aumenta la cantidad de fosfatidilserina cargada negativamente en el exterior (Suarez-Carmona *et al.*, 2015).



**Figura 1.1-5. Esquema para explicar selectividad celular de AMPs.** Extraída de Kumar *et al.*, 2018.

La disrupción de las membranas celulares podría deberse a la formación de poros u otros mecanismos; se han propuesto varios modelos que intentan explicarlos: modelo barril, de poro toroidal y de alfombra. Este último no implica la formación de poros (revisión Kumar *et al.*, 2018). En el modelo de barril se propone que en una primera instancia, los AMPs se orientarían paralelos a la membrana para luego insertarse perpendicularmente en la misma. Esto permitiría la interacción lateral entre las moléculas de péptidos de manera similar a las proteínas que forman canales: las zonas hidrofóbicas se orientan hacia la membrana y las hidrofílicas al interior (Figura 1.1-6a; Giuliani *et al.*, 2007; Ebenhan *et al.*, 2014). Este tipo de mecanismo ha sido observado en un número pequeño de AMPs, como alamethicina (Wimley, 2010), pardaxina (Rapaport y Shai, 1991) y protegrina (Brogden, 2005).



**Figura 1.1-6. Mecanismos de acción propuestos para AMPs.** Extraída de Kumar *et al.*, 2018

El modelo de poro toroidal propone también una inserción en la membrana pero, a diferencia del modelo anterior, la interacción de los péptidos con los fosfolípidos forma un poro mixto (fosfolípido-peptido). Un estudio de dinámica molecular sugiere que las porciones positivas de los péptidos interaccionan con las cabezas polares de los fosfolípidos facilitando la formación del poro que posteriormente conlleva a la disrupción de la membrana (Figura 1.1-6b; Sengupta *et al.*, 2008; Mihajlovic y Lazaridis, 2010). La formación de esta estructura dinámica y poco

estable permitiría que algunos AMPs se trasloquen al interior de la célula para acceder a moléculas blancos (Uematsu *et al.*, 2000).

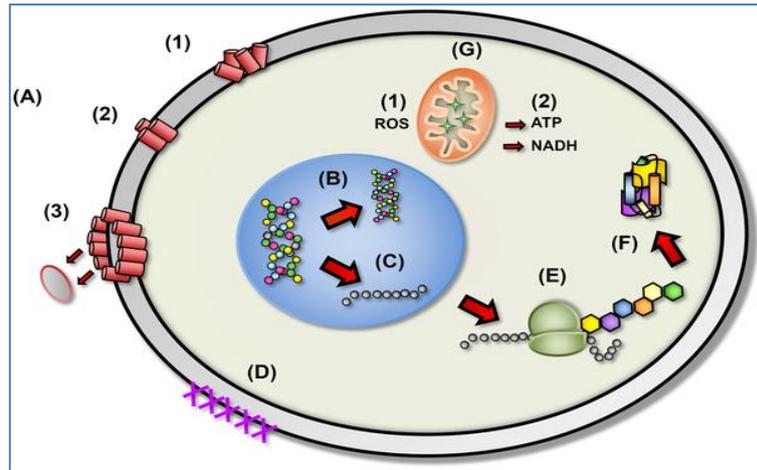
Por último, el modelo de alfombra propone que la acumulación del péptido en la superficie de las membranas genera tensión en la bicapa produciendo un efecto similar a un detergente, esto conlleva a la formación micelas péptido-fosfolípido y a la desintegración de la misma. Este modelo no requiere la inserción del AMP en la membrana ni interacciones específicas con esta (Figura 1.1.6 c y d; Brogden, 2005; revisión Nguyen *et al.*, 2011).

Estudios más recientes evidencian la interacción de AMPs con blancos intracelulares relacionados con la inhibición de la biosíntesis de elementos estructurales como la pared y membrana celular, la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Yount y Yeaman 2013, Ebenhan *et al.*, 2014). La interacción con componentes intracelulares y el hecho de que la disrupción de las membranas se ha observado mayoritariamente cuando las concentraciones están por encima de las necesarias para inhibir el crecimiento de microorganismos, sugiere que la disrupción no sería la causa primordial de la actividad antimicrobiana de todos los AMPs. En muchos casos, la interacción con la membrana permitiría la traslocación al interior para llegar a la molécula blanco (Rozek *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2010). En la figura 1.1-7 se detallan esquemáticamente posibles mecanismos de acción.

Particularmente en defensinas de plantas, se han caracterizado actividades de diversos tipos: inhibición de síntesis de proteínas estructurales, de canales de sodio, potasio y calcio, acción sobre tripsina y alfa amilasas de insectos que impiden la digestión; inactivación de toxinas bacterianas impidiendo el correcto plegamiento de las mismas (de Beer y Vivier, 2011; Jasso de Rodríguez *et al.*, 2015; revisión Kumar *et al.*, 2018). En el primer estudio relacionado a mecanismos de acción intracelular una defensina aislada de granos de *Hordeum vulgare* fue capaz de inhibir la traducción en reticulocitos de conejo (Mendez *et al.*, 1990). Terras y colaboradores (1995) fueron los primeros en reportar por visualización al microscopio una reducción en la elongación de hifas y aumento de la ramificación de las mismas en *Alternaria longipes* cuando se expone a varias defensinas de *Raphanus sativus*. Si bien no fueron capaces de explicar los mecanismos subyacentes

a este fenómeno, reportaron que la formación de la estructura tridimensional mediada por los enlaces disulfuro era crucial para la acción antifúngica.

La mayoría de las defensinas reportadas tienen acción antifúngica. Muchos estudios lo atribuyen a la interacción con componentes específicos de membranas y paredes celulares como glucosilceramidas, fosfolípidos y esfingolípidos, si bien cada péptido parece tener su propio modo de acción (revisión De Coninck *et al.*, 2013, revisión Lacerda *et al.*, 2014). Así por ejemplo, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en genes de biosíntesis de esfingolípidos, disminuyeron la sensibilidad a la acción del defensina DmAMP1 de *Dahlia merckii*. En el mismo trabajo, se demostró por fluorescencia con SYTOX Green, que la unión de la defensina al esfingolípido manosil-dinositol-foforilceramida M(IP)2C produce un aumento en el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  y cambios en el potencial de membrana que conllevan a un aumento en la permeabilidad y muerte celular. No está claro si la defensina se queda todo el tiempo en la membrana o luego se desplaza al interior (Thevissen *et al.*, 2000). En trabajos posteriores cepas con mutaciones de pérdida de función de la enzima glucosilceramida sintasa de *Fusarium graminearum* demostraron ser resistentes a la defensina MsDef (Ramamoorthy *et al.*, 2007). Los mecanismos de acción intracelulares son variados y dependen de la defensina en estudio. En el caso de la defensina NaD1 de *Nicotiana glauca* la interacción con componentes de la pared fúngica de *Candida albicans* permite la internalización vía endocitosis causando la granulación del citoplasma y muerte celular por acción sobre blancos intracelulares (Thevissen *et al.*, 2004). RsAFP2 de *Raphanus sativus*, desencadenaría la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la apoptosis celular de *C.albicans* (Aerts *et al.*, 2007), mientras PsD1 de *Pisum sativum*, es capaz de interactuar con una ciclina F, localizada en el núcleo, causando interferencias en el ciclo celular fúngico (Lobo *et al.*, 2007).



**Figura 1.1-7. Representación de los posibles mecanismos de acción de los AMPs.** (A) Ruptura de la integridad de la membrana: (1) los AMPs se insertan al azar en la membrana; (2) interaccionan entre sí a través de sus secuencias hidrofóbicas lo que causa (3) que una parte de la membrana sea removida y se forma un poro. (B) Inhibición de la síntesis de ADN. (C) Bloqueo de la síntesis de ARN. (D) Inhibición de las enzimas necesarias para la síntesis de la estructura de la pared celular. (E) Inhibición de ribosomas. (F) Bloqueo de chaperonas impidiendo el plegamiento de proteínas. (G) Inactivación de la mitocondria: (1) inhibición de la cadena respiratoria, (2) ruptura de la membrana mitocondrial. Extraído de Peters *et al.*, 2010.

El predecir su función es un gran desafío debido a como se mencionó anteriormente la variabilidad de secuencias, mecanismos y blancos de acción. Se ha identificado que el motivo  $\gamma$ -core GXCX<sub>4-6</sub>C ubicado en un *loop* y con abundancia de aminoácidos hidrofóbicos y catiónicos es clave en su acción antifúngica (van der Weerden *et al.*, 2013; Sagaram *et al.*, 2013; Parisi *et al.*, 2018). Estudios de química computacional y RMN sugieren que este motivo es el responsable de la interacción con glucosilseramidas de las membranas (de Paula *et al.*, 2011). El hecho de que la funcionalidad se relacione con residuos ubicados en *loops*, la zona más móvil del péptido, sugiere que la dinámica del mismo es crucial para la actividad (de Medeiros *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2013).

Los avances en los mecanismos que subyacen a la acción antimicrobiana, desde que se identificó el primer AMP, permiten afirmar cada vez más que péptidos con actividades similares pueden actuar por vías completamente diferentes y una misma molécula puede tener varios modos y blancos de acción. Este hecho conlleva a que todavía se requieran más investigaciones al respecto y que cada nuevo péptido identificado deba ser estudiado en profundidad.

#### 1.1.4. Producción de AMPs para su uso en agricultura, medicina e industria

El alto potencial de los AMPs como agentes antimicrobianos ha incentivado a los investigadores a buscar, caracterizar y sintetizar péptidos eficaces contra una gran variedad de patógenos. Si además, los AMPs encontrados son inocuos para el medio ambiente y el ser humano, podrían ser incluidos en productos utilizados para el manejo de plagas en la producción agrícola y para el desarrollo de nuevos fármacos o productos biotecnológicos ambientalmente amigables. En los últimos 25 años, se ha incrementado el número de patentes sobre estos péptidos y sus posibles aplicaciones. Para 45 patentes de defensinas vegetales revisadas y analizadas las aplicaciones propuestas fueron: diseño *de novo* de proteínas (2), nuevas proteínas con funciones (39), plantas transgénicas para control de enfermedades (2), uso médico como agente antimicrobiano (1) endulzante (1) (Yang y Lyu, 2008).

En producción agrícola, el control de patógenos es un factor determinante para asegurar la cosecha, mejorar rendimientos y aumentar la vida útil pos-cosecha. Estos patógenos pueden además deteriorar la calidad del producto (valor nutricional, características organolépticas), en algunos casos se producen la toxinas y alérgenos causando efectos nocivos para los consumidores (Díaz-Dellavalle *et al.*, 2011). Dado que los AMPs parecen tener actividades diversas contra diferentes microorganismos podrían ser útiles para mejorar los rendimientos agrícolas como nuevos agentes de control de plagas aumentando la resistencia de los cultivos al ataque de patógenos, ya sea mediante mejoramiento genético (desarrollo de cultivos transgénicos) o de productos que sustituyan los actuales agroquímicos. Podrían utilizarse también para incrementar la tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico, ya que se ha mostrado que algunos están involucrados en las respuestas de tolerancia a alta salinidad, sequía, altas concentraciones de metales pesados, etc.

Estudios de sobreexpresión de defensinas mediante transgénesis han resultado en plantas con resistencia incrementada contra varias enfermedades fúngicas (Gao *et al.*, 2000; Portieles *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). Varias defensinas han demostrado tener actividad contra patógenos humanos: HsAFP1 de *Heuchera sanguinea* inhibe el desarrollo de *C.albicans* (Thevissen *et al.*, 2004), y producida de forma recombinante

inhibe la formación de biofilms (Vriens *et al.*, 2015); RBAFP y PBAFP aisladas de *Phaseolus vulgaris* inhiben la actividad de la transcriptasa reversa del virus VIH *in vitro* (revisión Carvalho y Gomes, 2009; Hegedüs y Marx, 2012). Ejemplos de defensinas con actividades probadas se especifican en la figura 1.1-8 (revisión Thomma *et al.*, 2002; revisión Lay y Anderson, 2005; Spelbrink *et al.*, 2004; revisión Parisi *et al.*, 2018).

En los últimos años están siendo estudiados AMPs naturales y sintéticos por su potencial como preservantes para agregar a los films en embalajes de comestibles. La disponibilidad de nuevos AMPs bioactivos abrirá, por lo tanto, la posibilidad de aumentar los rendimientos agrícolas, no sólo durante la etapa de producción, sino también para el empaquetado de frutas y verduras poscosecha.

Biological activity	Examples	Plant source
Antifungal	Rs-AFP1-4 Ah-AMP1 AlfAFP	<i>Raphanus sativus</i> <i>Aesculus hippocatanum</i> <i>Medicago sativa</i>
Antibacterial	Pth-St1 Fabatin-1 and -2 SoD1-7	<i>Solanum tuberosum</i> <i>Vicia faba</i> <i>Spinacia oleracea</i>
Insecticidal	VrCRP	<i>Vigna radiata</i>
Protein synthesis inhibitor	$\gamma$ 1-H $\gamma$ 1-P $\omega$ -H HvAMP1	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Triticum turgidum</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Hardenbergia violacea</i>
$\alpha$ -amylase inhibitor	SI $\alpha$ 1-3	<i>Sorghum bicolor</i>
Proteinase inhibitor	CfD2 Cp-thionin	<i>Cassia fistula</i> <i>Vigna unguiculata</i>
Sodium channel inhibitor	$\gamma$ 1-Z and $\gamma$ 2-Z	<i>Zea mays</i>

Figura 1.1-8. Ejemplos de actividades biológicas y modos de acción demostrados para algunas defensinas de plantas. Extraída de Lay y Anderson, 2005.

A nivel clínico, existen evidencias de que los AMPs presentan una acción incrementada contra bacterias resistentes a antibióticos. Por ser además, importantes moléculas efectoras durante la inflamación y cicatrización de heridas son moléculas muy prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos con acción antibiótica y anti-inflamatoria (Kaur *et al.*, 2011; Shah y Read, 2013). Hasta la fecha, las defensinas vegetales que han sido analizadas con respecto a su actividad frente a células de mamíferos mostraron no tener efectos tóxicos (revisión Carvalho y Gomes, 2009). Varias compañías biotecnológicas están evaluando AMPs de origen natural y sintéticos para aplicaciones terapéuticas como la administración tópica, tratamientos sistémicos de infecciones y/o control de enfermedades de transmisión alimentaria (Shah y Read, 2013).

En la última década, las herramientas bioinformáticas han permitido identificar genes que codifican AMPs en varias especies vegetales. Debido a la mayor disponibilidad de datos moleculares, las plantas cultivadas y las especies modelo han sido el principal blanco. Las especies nativas continúan siendo poco exploradas debido, principalmente, a que sus ómicas no están disponibles (Pestana-Calsa *et al.*, 2010). Actualmente, las tecnologías de secuenciado masivo (NGS-*Next Generation Sequencing*), permiten a costos razonables, el análisis global de genomas y transcriptos en una célula o tejido, aun sin ninguna información genómica previa. El secuenciado masivo de ARN (RNA-seq) ha permitido generar el primer transcriptoma para la remolacha azucarera sin la necesidad de un genoma de referencia, identificando genes que se expresan frente a tratamientos de vernalización y respuesta a giberelinas (Mutasa-Göttgens *et al.*, 2012). Estas tecnologías abren entonces nuevas puertas para encontrar genes que codifiquen péptidos novedosos en los transcriptomas de especies poco exploradas como las nativas (Lister *et al.*, 2009).

Una vez identificada una nueva especie bioactiva, su desarrollo para usos biotecnológicos presenta varios desafíos relacionados a la producción y caracterización: la posible toxicidad intrínseca, estabilidad, identificación de mecanismos de acción, etc. Para la caracterización de un nuevo AMP es necesario contar con cantidades significativas de la molécula que permitan efectuar los ensayos correspondientes. Los métodos usados en la actualidad para recuperación y

producción son: aislamiento directo de fuentes naturales, síntesis química y expresión recombinante. La extracción a partir de fuentes primarias ha sido exitosa en algunos casos como por ejemplo el de licotoxina de *Lycosa carolinensis* (Yan y Adams, 1998) y la strongylocina de *Strongylocentrotus droebachiensi* (Li *et al.*, 2008). En ambos casos debido a que la concentración de AMPs existente en los organismos es generalmente baja, fue necesario utilizar volúmenes de muestra muy grandes para realizar la caracterización del péptido en cuestión. Además, el proceso de extracción y purificación a partir de fuentes vegetales es costoso, complejo, poco amigable con el medio ambiente y la actividad biológica del péptido extraído puede depender del tejido de origen, el estado de desarrollo de la planta o el tiempo desde la cosecha (Hayek *et al.*, 2013). La producción de péptidos por síntesis química a partir de la secuencia primaria, si bien ha demostrado ser efectiva a pequeña escala, también es un proceso costoso y complejo, especialmente en moléculas con puentes disulfuro como son la mayoría de los AMPs. El método más ampliamente utilizado es la expresión heteróloga, que ha demostrado ser más adecuado para la producción a mediana y gran escala debido al mayor rendimiento y menor costo relativo de producción, si bien requiere una etapa importante de estandarización de condiciones (Parachin *et al.*, 2012).

### **1.1.5. Producción heteróloga**

En las últimas décadas, varios sistemas de expresión se han desarrollado para alcanzar una producción costo-efectiva a mediana y gran escala de varias proteínas, en diversos hospederos como bacterias, levaduras, hongos y plantas. Los sistemas microbianos *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* son los más populares para expresar proteínas recombinantes, debido a sus altas tasas de crecimiento, vasto conocimiento sobre su genética y fisiología (Figura 1.1-9; Vijayan *et al.*, 2008; Kant *et al.*, 2009; de Beer y Vivier, 2011; Kovaleva *et al.*, 2011; Tomisawa *et al.*, 2015, Rodriguez Decuadro *et al.*, 2018).

Expression system	Mainly promoter	AMP	Vector	Promoter	
<i>E. coli</i>	Inducible	Stomox-ynZH1	pET	T7	
		AN5-1	pHUE		
		ABP-dHC-cecA	pSUMO		
<i>B. bacillus</i>	Inducible	CAM-W	pDM030	Glv	
	Constitutive	Cecropin AD	pGJ	P43	
<i>P. pastoris</i>	Inducible	SN-1	pPIC9k	AOX1	
	Inducible	PaDef	pPICZ $\alpha$ A	AOX1	
	Inducible	MP1106	pPICZ $\alpha$ A	AOX1	
	Inducible	LFcinC	pHIL $\alpha$	AOX1	
	Inducible	hepcidin-25	pPICZ $\alpha$ A	AOX1	
	Inducible	Abaecin	pPIC9K	AOX1	
	Inducible	Psc-AFP	pPIC9K	AOX1	
	Inducible	Protegrin-1	pPICZ $\alpha$ A	AOX1	
	Inducible	$\beta$ -defensin2	pPICZ $\alpha$ A	AOX1	
	Inducible	CecP4	pPICZB	AOX1	
	Inducible	NZ17074	pPICZ $\alpha$ A	AOX1	
	Inducible	Fowlicidin-2	pPICZ $\alpha$ A	AOX1	
	Inducible	Ps-BD2	pPIC9K	AOX1	
	Inducible	NZ2114	pPICZ $\alpha$ A	AOX1	
	Constitutive	Plectasin	pGAPZ	GAP	
	Constitutive	cecropin D	pGAPZ $\alpha$ A	GAP	
	Constitutive	MP1102	pGAP	GAP	
	<i>S. cerevisiae</i>	Constitutive	Hbd-1	pVT103L	ADH1
		Constitutive	plantaricin 423	pPRL2	ADH1
Inducible		L50A and L50B	pYES2	GAL1	

**Figura 1.1-9. Principales características de los sistemas de expresión utilizados en la producción de AMPs.**  
 Extraído de Deng *et al.*, 2017.

Además se han generado varios sistemas organismo/vector con funciones alteradas que favorecen la producción de AMPs, como cambios en los ARNt presentes en la cepa, capacidad para introducción de modificaciones postraduccionales, etc. (Silva *et al.*, 2011). Alternativamente pueden usarse plantas como *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana* (Theviessen *et al.*, 2007; Padovan *et al.*, 2010; Abdallah *et al.*, 2010).

Uno de los sistemas más usado a escala analítica, es *E. coli* transformado con los vectores de la serie pET desarrollados por Novagen que contienen el promotor fuerte T7 que es inducible por lactosa y análogos (revisión Correa y Opezzo, 2015; revisión Deng *et al.*, 2017). Sin embargo, la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* y en particular la expresión de defensinas, a menudo resulta en la acumulación de las proteínas de interés en forma de agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión (Kovalskaya y Hammonda., 2009). Algunas estrategias para favorecer la obtención de la proteína en la fracción soluble son: i) trabajar con un organismo productor que favorezca la formación de puentes disulfuro, en el caso de las defensinas; ii) trabajar con los codones comunes del organismo productor, ya que

si la secuencia de interés contiene codones “raros” se puede originar una terminación prematura de la síntesis proteica; iii) asociarla a una proteína *carrier* o *de fusión*, la cual además incrementa la solubilidad (Terpe, 2003).

**Cepas hospederas y optimización de codones.** La utilización de cepas mejoradas es una estrategia que permite aumentar rendimientos. Algunas de las cepas más usadas para la expresión de péptidos antimicrobianos son *C41* (Sigma Aldrich), *BL21*, *Origami™*, *Rosetta*, *Rosetta Gami* (Novagen), *Shuffle* (New England). Todas estas cepas son del tipo DE3, es decir que contienen una copia del gen que codifica la enzima T7 ARN polimerasa bajo el control del operón lacUV5, haciéndolas adecuadas para la producción de proteínas clonadas en vectores pET. Existen variantes que portan un plásmido extra, compatible con los del tipo pET, que contiene el gen T7 Lisosima (pLys), un inhibidor natural de T7 ARN polimerasa.

Esta estrategia permite la supresión de la expresión basal de la polimerasa y por lo tanto, de la proteína recombinante, que en el caso de los péptidos antimicrobianos puede afectar el crecimiento de las células transformadas en las primeras etapas de la producción. Las células *Origami™* y *Shuffle* tienen además, mutaciones de pérdida de función en los genes tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatiónato reductasa (*glo*) promoviendo la formación de puentes disulfuro en el citoplasma. *Shuffle* a su vez, contiene en su cromosoma el gen de la isomerasa de puentes disulfuro DsbC, que corrige enlaces mal formados y ayuda en el plegado de la proteína recombinante. La cepa *Rosetta™* contiene secuencias de tRNA raros para *E.coli*, permitiendo la expresión de proteínas eucariotas. *Rosetta-gami™* combina la capacidad de formar puentes disulfuro de *Origami* y los tRNAs para codones raros de *Rosetta*. Los tRNAs suplementarios son para los codones AGG y AGA para arginina, AUA para isoleucina, CUA para leucina, CCC para prolina y GGA para glicina.

Otra forma de sortear la dificultad de los codones “raros” para el organismo productor es realizar la optimización de codones, es decir cambiarlos por otros que sean “comunes” en este organismos. En producciones heterólogas en *E.coli* es recomendable además, el cambio de codón de terminación (STOP) TGA por TAA (Johansson *et al.*, 1999). En la producción de la  $\beta$  defensina-2 de humanos (hBD2),

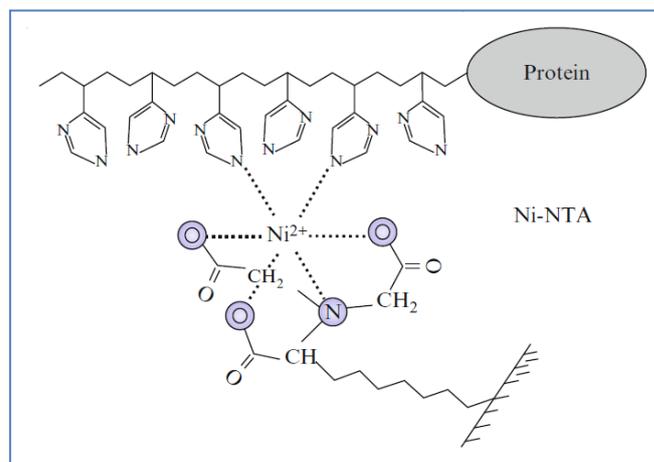
por ejemplo los rendimientos aumentaron 9 veces luego de la optimización de los codones (Peng *et al.*, 2004).

**Proteínas de fusión o carrier y etiquetas de afinidad.** La expresión de proteínas recombinantes unidas a un carrier en el extremo amino o carboxilo terminal permite, además de disminuir la formación de cuerpos de inclusión, protegerlas de degradación proteolítica dentro de la célula y en el caso de AMPs, enmascarar actividad, es decir los potenciales efectos tóxicos para el hospedero. Diferentes proteínas han sido utilizadas como *carriers* para la expresión de AMPs: SUMO (*small ubiquitin-related modifier*, Li *et al.*, 2011), F4 (fragmento de purF, Kim *et al.*, 2008), TrxA (Tiorredoxina A, La Vallie *et al.*, 2000), GFP (*Green Fluorescent Protein*, Skosyrev *et al.*, 2003), MBT (*Maltose Binding Transfer*, Nallamsetty y Waugh, 2007), GST (Glutacionato Transferasa, Sun *et al.*, 2012). Las dos últimas, si bien no son las más usadas, cumplen también la función de etiqueta de afinidad para la purificación en columna: - MBT se une a resinas de amilasa y la elución puede realizarse con maltosa libre (Pattenden y Thomas, 2008); - GST se une a resinas de glutacionato y se eluye con glutacionato reducido (Sun *et al.*, 2012). La proteína de fusión más usada hasta la fecha es Trx A debido a su tamaño pequeño (11.8kDa), termo estabilidad ( $T_m$  85°C) y a su capacidad de actuar como chaperona.

Las etiquetas de afinidad (tag) se utilizan para, como se mencionó, la purificación en columna la proteína recombinante luego de la producción. Al igual que las proteínas *carrier*, pueden ubicarse en el extremo amino o carboxilo terminal, son secuencias específicas que se unen por afinidad a matrices o moléculas presentes en la columna. La más usada para la purificación en *E.coli* es la etiqueta HisTag debido a su pequeño tamaño y su naturaleza inerte. Consiste en 6 a 10 residuos de histidina en tándem (0.84kDa-1.4kDa) que pueden interactuar reversiblemente con metales durante la purificación en columnas de afinidad de metales inmovilizados (IMAC). Las proteínas con esta etiqueta permanecen unidas a la columna y luego pueden ser eluidas con un competidor fuerte como imidazol; para la unión no es necesario que exista una estructura terciaria por lo que la purificación puede realizarse aún en condiciones desnaturalizantes (Zhu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004).

**Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados** (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*; Porath *et al.*, 1975). La cromatografía IMAC se basa en la afinidad que presentan los metales de transición como  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ , por histidinas y cisteínas en soluciones acuosas. En la matriz, generalmente de sefarosa, se encuentra unido un agente quelante que fija los metales. Existen varios tipos de agentes aunque el más usado debido a los rendimientos en la purificación es el ácido trinitrilo acético (NTA, *nitrilictriacetic acid*; Hochuli *et al.*, 1987). El NTA unido a la resina se coordina al metal por cuatro valencias (tetradentado) permitiendo que dos de ellas queden libres para interactuar con los residuos de la proteína (Figura 1.1-10).

La elección del metal depende de la aplicación y de la proteína que se desee purificar, aunque se ha observado que la utilización de NTA con metales que generen dos sitios de coordinación como el  $Ni^{+2}$  y el  $Co^{+2}$  permite obtener una mayor recuperación de la proteína de interés (revisión Block *et al.*, 2009).



**Figura 1.1-10.** Esquema de interacción entre los residuos de Histidina de la proteína y el Níquel coordinado con NTA. Extraído de Block *et al.*, 2009

La técnica de IMAC además de ser rápida y de bajo costo a pequeña escala, permite trabajar en condiciones desnaturizantes de hasta 8M de urea y 6M de hidrocloreuro de guanidina (Hochuli *et al.*, 1988). De esta forma es posible realizar el replegado de la proteína desnaturizada directamente en la columna por gradiente del agente desnaturizante, técnica que ha sido empleada cuando las proteínas se encuentran

en forma insoluble (Jungbauer *et al.*, 2004). Este tipo de columnas es además, compatible con una gran variedad de agentes químicos como detergentes, sales, agentes reductores, permitiendo realizar la purificación directamente del producto de extracción, sin necesidad de realizar cambios de buffer (Figura 1.1-11).

Luego de la producción y purificación de la proteína recombinante, el péptido de interés puede separarse del *carrier* y etiqueta de afinidad mediante clivaje químico o por proteasas específicas. Este último es el método más usado a escala analítica, por lo tanto la construcción en el vector de expresión debe poseer el sitio de reconocimiento adecuado para la enzima que se va a utilizar, a excepción del sistema SUMO cuya estructura terciaria es reconocida por la proteasa UPL1 de levadura (Bommarius *et al.*, 2010). Algunas de estas enzimas y sus secuencias de reconocimiento se listan en la figura 1.1-12.

IMAC chemical compatibility			
Component	Limitation (up to)	Component	Limitation (up to)
<b>Buffers</b>		<b>Salts</b>	
Na-phosphate	Recommended, limit not known	NaCl	4 M
Phosphate citrate	Limit not known	MgCl <sub>2</sub>	4 M
Tris-HCl, HEPES, MOPS	100 mM	CaCl <sub>2</sub>	5 mM <sup>f</sup>
Citrate	60 mM	NaHCO <sub>3</sub>	Not recommended
<b>Detergents (in 300 mM NaCl)</b>		Ammonium salts	Not recommended
<i>n</i> -Hexadecyl- $\beta$ -D-maltoside	0.0003% (w/v)	<b>Protease inhibitors</b>	
<i>n</i> -Tetradecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside	0.005% (w/v)	EDTA	1 mM <sup>g</sup>
<i>n</i> -Tridecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside	0.016% (w/v)	Commonly used protease inhibitors <sup>d</sup>	Compatible in effective concentrations
Brij 35	0.1% (v/v)	Complete cocktail (EDTA-free)	1 $\times$ concentrated
Digitonin	0.6% (w/v)	<b>Denaturants</b>	
Cymal 6	1% (w/v)	Urea	8 M
<i>n</i> -Nonyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (NG)	1% (w/v)	Gu-HCl	6 M
<i>n</i> -Decyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DM)	2% (w/v)	<b>Amino acids</b>	
<i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM)	2% (w/v)	Histidine	1–2 mM <sup>h</sup>
C12-E9	1% (w/v)	Glycine	Not recommended
<i>n</i> -Octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OG)	1.5% (w/v)	Cysteine	Not recommended
Triton X-100, Tween, NP-40	2% (v/v)	Glutamate	Not recommended
Triton X-114	2% (v/v)	Aspartate	Not recommended
Fos-Cholines	0.05% (w/v)	Arginine	500 mM
Dodecyltrimethyl-phosphineoxide	0.15% (w/v)	<b>Organic solvents</b>	
<i>N,N</i> -Dimethyldodecylamine- <i>N</i> -oxide (LDAO)	0.7% (w/v)	Isopropanol	60% (v/v) <sup>e</sup>
CHAPS	1% (w/v)	Ethanol	20% (v/v)
Lauroyl-sarcosine	1% (w/v)	<b>Reducing reagents</b>	
SDS	0.3% (w/v) <sup>a</sup>	$\beta$ -ME	20 mM
<b>Other</b>		TCEP	20 mM
EGTA	1 mM <sup>g</sup>	DTT	10 mM
Imidazole	10–20 mM <sup>h</sup>	DTE	10 mM
Hemoglobin	Not recommended		
Glycerol	50% (v/v)		

**Figura 1.1-11. Compatibilidad y limitaciones en la purificación de proteínas con motivos His-Tag de las resinas de Ni-NTA con agentes químicos comúnmente usados.** Extraído de Block *et al.*, 2009

Si bien se han observado buenos rendimientos en la producción de algunos AMPs en ciertas condiciones dadas, no existe un sistema (carrier, vector, etiqueta, cepa, temperaturas, tiempos) específico y optimizado común para la expresión de proteínas recombinantes. El sistema a utilizar depende de la proteína en cuestión y debe ser determinado empíricamente (Hammarstrom *et al.*, 2002). Además los sistemas antes descritos, son generalmente empleados para producción a escala analítica, o sea para la obtención de cantidades suficientes únicamente para la caracterización. Luego de esta etapa deben explorarse otras estrategias de producción más baratas y con mayores rendimientos para la producción a gran escala.

Excision site	Cleavage enzyme	Commercial provider
Asp Asp Asp Asp Lys↓	Enterokinase	New England Biolabs
Ile Glu/Asp Gly Arg↓	Factor Xa protease	Different distributors
Leu Val Pro Arg↓Gly Ser	Thrombin	Different distributors
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln↓Gly	TEV protease	Invitrogen
Leu Glu Val Leu Phe Gln↓Gly Pro	PreScission™ protease	GE Healthcare

**Figura 1.1-12. Proteasas más comúnmente usadas para el clivaje de proteínas de fusión.** Extraído de Deng *et al.*, 2017.

## 1.2 Compuestos fenólicos

### 1.2.1. Preservantes naturales de madera

La madera ha sido y es ampliamente usada desde tiempos remotos en construcción por ser un material accesible, renovable, que requiere relativamente bajos niveles de energía para su transformación. Sin embargo, es un material natural y en consecuencia degradable tanto por agentes bióticos (hongos, bacterias, insectos) como abióticos (radiación UV e IR, humedad, fuego) y para prevenir esta degradación debe ser tratada.

El preservante más usado en Uruguay continúa siendo el CCA, formado por óxidos de cromo, cobre y arsénico. Sin embargo su uso se ha ido limitando y prohibiendo

cuando la madera tratada está en contacto con personas y animales, fundamentalmente en Europa, EEUU y Japón, debido al efecto del cromo (VI) y arsénico (V) sobre el medio ambiente y la salud (Coggins, 2003; EPA, CCA *Research*, 2004). Estas restricciones han promovido la investigación sobre nuevos productos naturales bioactivos procurando que sean de una elevada efectividad, costos accesibles y ambientalmente amigables.

Algunas especies de plantas leñosas tienen la habilidad inherente de resistir la degradación biológica (principalmente por hongos e insectos), característica definida como “durabilidad natural” o “resistencia al deterioro” (Zabel y Morrell, 1992; Eaton y Hale, 1993). Esta capacidad depende de la composición química, es decir contenido de celulosa (40-50% peso seco) y e hemicelulosa (20-30% peso seco); contenido y tipo de lignina (25-30% peso seco); pero sobre todo del contenido de metabolitos secundarios, llamados extractivos (2 a 10% peso seco en especies de clima templado y hasta 20% en maderas de clima tropical) (Vek *et al.*, 2013, Kirker *et al.*, 2013).

Los metabolitos secundarios son además cruciales para aspectos funcionales durante el ciclo vital de las plantas como la protección de tejidos estructurales, señalización, interacción con otros organismos, etc. La cantidad y tipo de metabolitos secundarios sintetizados por una planta es variable (generalmente varios de miles) y dependiente de factores como el clima, características del suelo, condiciones nutricionales, tejido, estado de desarrollo, etc. Los extractivos de madera pueden ser extraídos tanto con agua como con solventes orgánicos y se dividen en dos grandes grupos: i) compuestos alifáticos y alicíclicos (terpenos, terpenoides, resinas ácidas, ésteres de ácidos grasos); ii) compuestos fenólicos (fenoles simples, lignanos, isoflavonoides, taninos condensados e hidrolizables y flavonoides simples; Stenius, 2000).

La corteza y la zona más interna de la madera, denominada duramen, tienen mayores concentraciones de extractivos que la albura (zona más externa de la madera; figura 1.2-1; revisión Taylor *et al.*, 2002). La función antimicrobiana de estos compuestos se ha demostrado en estudios donde maderas durables se vuelven susceptibles al deterioro por microorganismos cuando se realiza la extracción de los

mismos (revisión Taylor *et al.*, 2002; Tascioglu *et al.*, 2013; Kirker *et al.*, 2013). En estudios con varias *taxas* de plantas, se observó que la actividad biocida de los productos de extracción depende, tanto de la muestra (albura, corteza, duramen) como del método utilizado y que formulaciones de mezclas de varios metabolitos tiene un mayor efecto biocida. Zhou y colaboradores (2007 a) por ejemplo, observaron que la efectividad del timol, principal componente del aceite de tomillo, aumentaba considerablemente cuando se combinaba con ácidos orgánicos. El timol en solución ácida era capaz de romper paredes bacterianas y este daño permitía la entrada de los ácidos orgánicos que potenciaban el efecto apoptótico. Asimismo, Hsu y colaboradores (2007) observaron el efecto sinérgico del cinamoaldehído con taninos hidrolizables en relación a la capacidad antifúngica.

El estudio de extractivos de maderas con “durabilidad natural” como posibles preservantes de maderas “blandas” es un campo que ha crecido considerablemente. Si bien existen productos comerciales como Cedarshield ® y Termilone ®, la mayor limitante se debe a que por su condición de metabolitos secundarios, el contenido en cada muestra es muy variable y es difícil establecer procesos o métodos de extracción que aseguren un producto final estandarizado en composición y cantidad (Scheffer y Cowling, 1966;revisión Singh y Singh, 2012).

En particular los compuestos fenólicos han sido muy estudiados ya que, además de presentar actividad antimicrobiana, poseen capacidad antioxidante y se ha observado que tienen actividad antifúngica *in vitro* contra basidiomicetes de pudrición blanca y marrón, causantes del 90% de la descomposición de la madera. El principal mecanismo implicado en la degradación de lignina utilizado por estos hongos es el mediado por radicales libres generados por enzimas extracelulares oxidasas y peroxidasas (Backa *et al.*, 1993; Hirano *et al.*, 2000; Hammel *et al.*, 2002).

La importancia de los compuestos fenólicos está relacionada con su estructura química: grupos hidroxilos unidos directamente a un anillo aromático. La interacción de estos hidroxilos de los fenoles con los electrones  $\pi$  de los anillos les confiere la habilidad de generar radicales libres de larga vida media que son necesarios en procesos de oxido-reducción en las células. Esta deslocalización electrónica estabilizada es la responsable de propiedades antioxidantes que les

permiten neutralizar especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive oxygen species*) impidiendo que provoquen efectos nocivos como mutagénesis de ácidos nucleicos, desestabilización de membranas, inactivación o desnaturalización de enzimas, etc. (Heim *et al.*, 2002). Además los compuestos fenólicos son capaces de formar complejos estables con polímeros estructurales celulosa, hemicelulosa y lignina provocando que sean menos accesibles para su degradación (Kirker *et al.*, 2013).

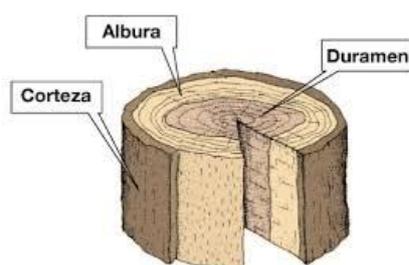


Figura 1.2-1. Estructura macroscópica de un leño.

### 1.2.2. Clasificación de compuestos fenólicos

El número de compuestos fenólicos vegetales conocido es cada vez mayor, algunos son indispensables para el crecimiento y reproducción de las plantas y otros son responsables de mecanismos de defensa contra organismos patógenos, depredadores o radiación ultravioleta. Constituyen un grupo muy amplio que va desde moléculas pequeñas como los flavonoides a grandes compuestos como los taninos condensados. Se encuentran de forma constitutiva en casi todos los órganos y tejidos (hoja, frutos, semillas, raíces, madera y corteza) de un gran número de plantas, tanto leñosas como herbáceas. Generalmente son sólidos de color blanco aunque también amarillos o incluso, las moléculas más complejas, rojas (Vek *et al.*, 2013).

Los compuestos fenólicos en las plantas pueden formarse por dos vías: la vía shikimato/ fenilpropanoide o la vía "poliquétida" acetato/malonato (Quideau *et al.*, 2011). La vía de shikimato comienza con la desaminación del aminoácido L-fenilalanina a ácido cinámico por la enzima L-fenilalanina amonio liasa (PAL), descrita por Koukol y Conn (1961). Una segunda etapa es la conversión del ácido

cinámico a ácido *p*-cumárico por la enzima cinamato hidroxilasa (CH<sub>4</sub>) (Rasmussen y Dixon, 1999). La vía poliquétida tiene como intermediario malonil-CoA que proviene del ciclo del ácido cítrico. Los siguientes mecanismos que conllevan a la formación de compuestos fenólicos parecen ser complejos y multienzimáticos siendo un intermediario crucial para ambas vías el *p*-cuomaroil-CoA (Figura 1.2-2; Boudet, 2007).

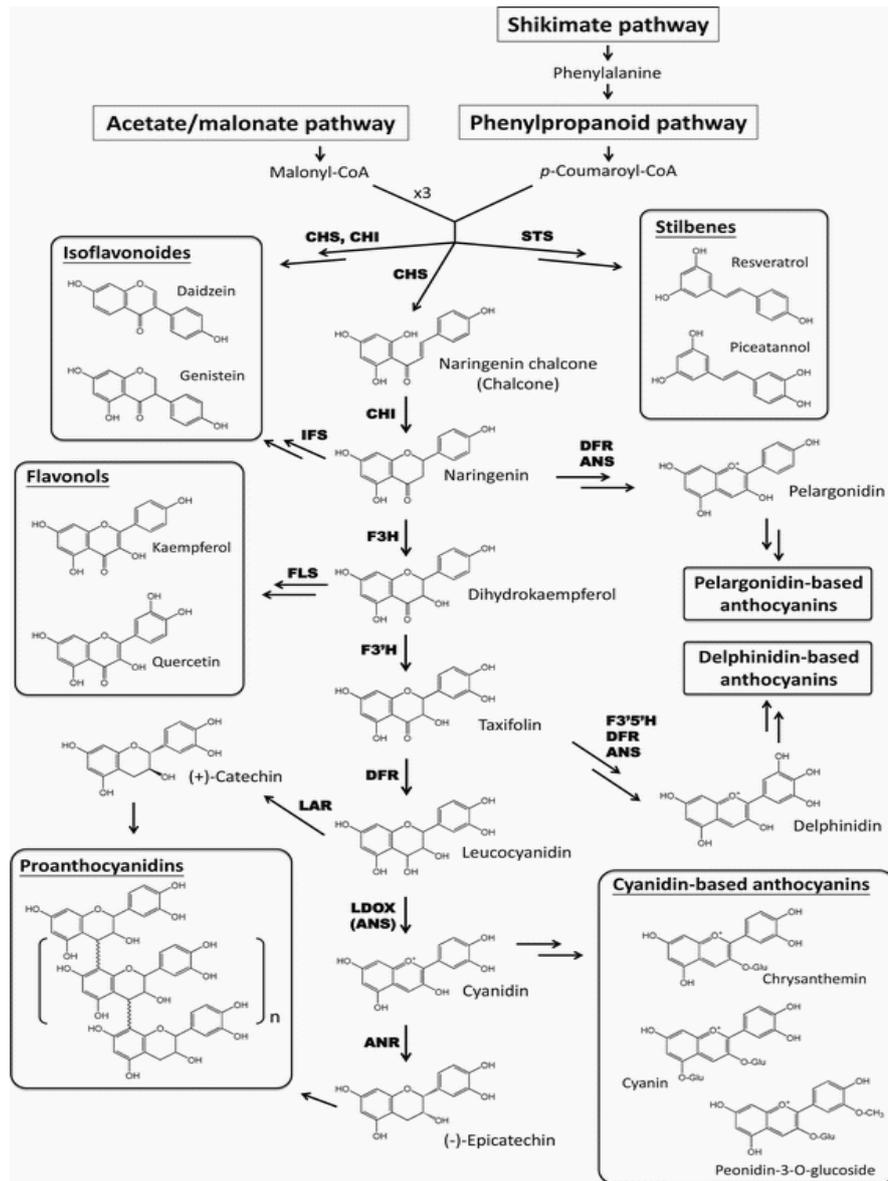


Figura 1.2-2. Principales vías de formación de compuestos fenólicos. Extraído de Boudet, 2007.

## a) Flavonoides

Los flavonoides son los compuestos fenólicos más estudiados, debido principalmente a su conocido beneficio para la salud humana. En los organismos se relacionan con la transferencia de energía, respiración, morfogénesis, determinación del sexo, son precursores de hormonas y existe evidencia de que están involucrados en la regulación génica de procesos metabólicos (revisión Cushnie y Lamb, 2005). Son compuestos fenólicos simples, heterogéneos y de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6) formado por dos anillos fenilos (A y B) ligados entre sí a través de un anillo C de pirano, que generalmente conforman un heterociclo oxigenado (Figura 1.2-3). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. Contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que pueden encontrarse en diferentes posiciones.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en: i) flavanos, como la Catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C; ii) flavonoles, como la Quercetina, que posee además del OH en posición 3 un oxígeno en posición 4 y una mayor deslocalización de los electrones por el doble enlace entre los carbonos 2 y 3; iii) flavonas, también con un oxígeno en el carbono 4, aunque carecen del grupo hidroxilo; iv) antocianidinas, que tienen el grupo -OH en posición 3 pero además un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Figura 1.2-3).

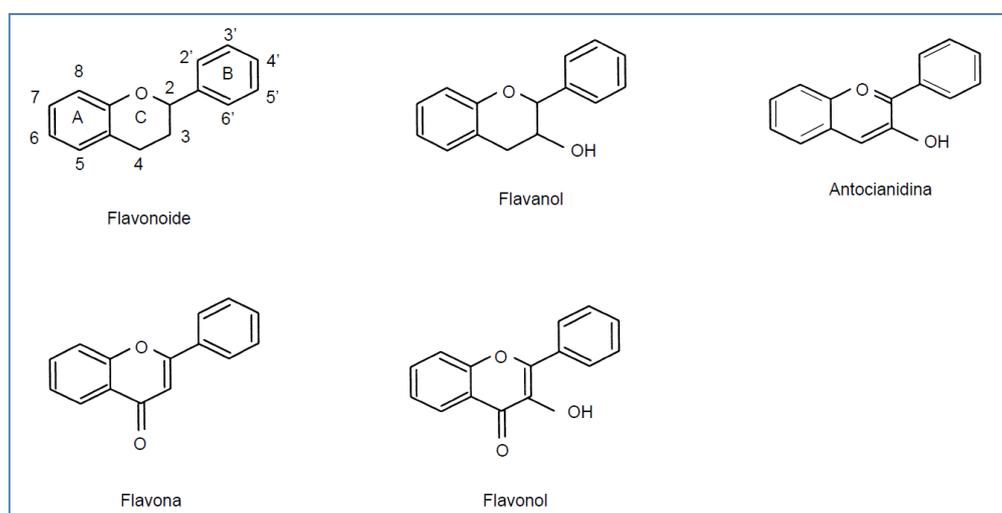


Figura 1.2-3. Estructura básica de flavonoides. Extraída de Ricco *et al.*, 2015

Los flavonoles y las flavonas generalmente están glicosilados en la posición 3 del anillo C, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente aunque también pueden estar unidos a D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, ácido D-glucurónico. La porción sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona. Se han encontrado más de 20000 estructuras que difieren en la disposición de los grupos hidroxilos, en el grado de metilación o de glicosilación y el estado de oxidación de la aglicona. Tienen propiedades ácido-base, son neutros en medio ácido (por debajo de pH 3) y poseen carga negativa a pH 7. Las repercusiones de la carga negativa son sumamente importantes en la evaluación del potencial antimicrobiano ya que el radical cargado negativamente no es probable que interactúe o atraviese la membrana celular negativa de microorganismos (revisión Martínez-Florez *et al.*, 2002, revisión Heim *et al.*, 2002; revisión Cushnie y Lamb, 2005).

## **b) Taninos**

Los taninos vegetales constituyen la más amplia distribución de todos los polifenoles y se encuentran principalmente en las estructuras leñosas de plantas superiores (Adamson *et al.*, 1999). La palabra tanino proviene del francés "*tanin*" que significa *corteza de la encina para curtir pieles*, se relaciona con el proceso de la curtiembre del cuero que se realizaba con extractos de plantas. La definición más aceptada es la de Bate-Smith y Swanin (1962) que los describen como compuestos fenólicos solubles en agua que tienen la capacidad de precipitar proteínas y algunos alcaloides (revisión Le Bourvellec y Renard, 2012). Esta propiedad, conocida como astringencia, hace que sean de interés en industrias tan variadas como la de curtiembre de cuero, farmacéutica y alimentaria, entre otras.

Se clasifican según su estructura en tres grupos: i) taninos condensados (proantocianidinas), formados por unidades de flavonoides; ii) taninos hidrolizables que incluyen los galotaninos, formados por unidades de ácido gálico formando ésteres con D-glucosa, y los elagitaninos derivados del ácido hexahidroxiidifénico

que se forma a partir del acoplamiento oxidativo de ésteres de ácido gálico iii) taninos complejos formados por una molécula de flavonoide unida por un grupo glicósidico a un galo o elagitanino (Figura 1.2-4, revisión Khanbabaee y Van Ree, 2001; Buzzini *et al.*, 2008). Su peso molecular va desde 500 a 5000 Da para los hidrolizables mientras que los condensados pueden llegar a pesos moleculares de 20000 Da. Estos últimos pueden estar formados por hasta 17 moléculas de flavonoides aunque se cree que en la naturaleza existen grados de polimerización mayores. Los taninos hidrolizables son menos comunes que las proantocianidinas siendo encontrados solamente en 15 de los 40 órdenes de eudicotiledoneas (Quideau *et al.*, 2011). Los hidrolizables en solución ácida o alcalina se separan en sus componentes: un azúcar y ácidos carboxílicos de compuestos fenólicos; los condensados por el contrario no experimentan esta hidrólisis (Haslam, 1996).

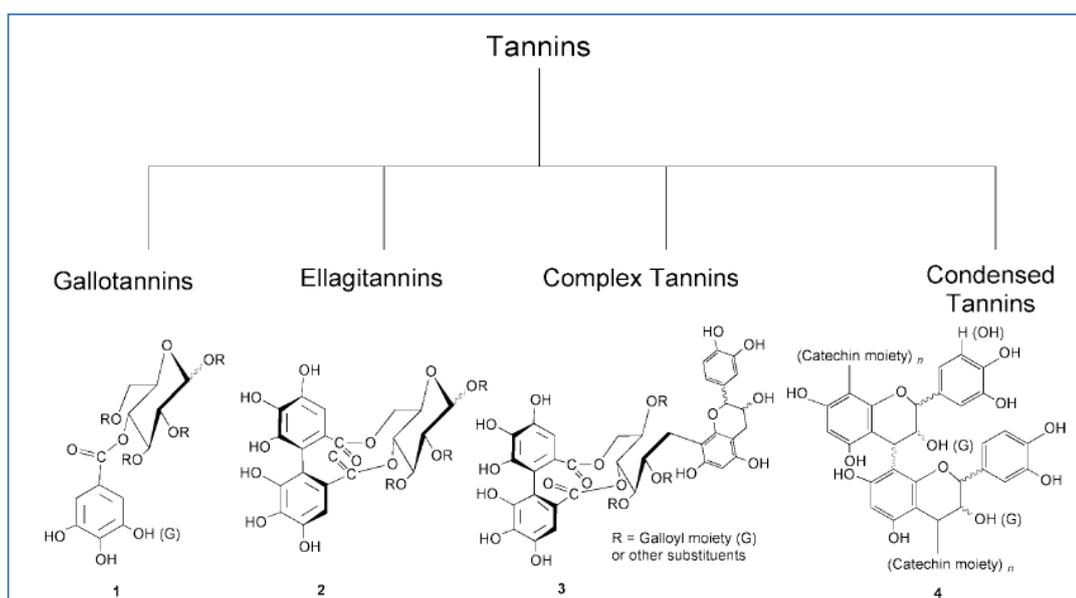
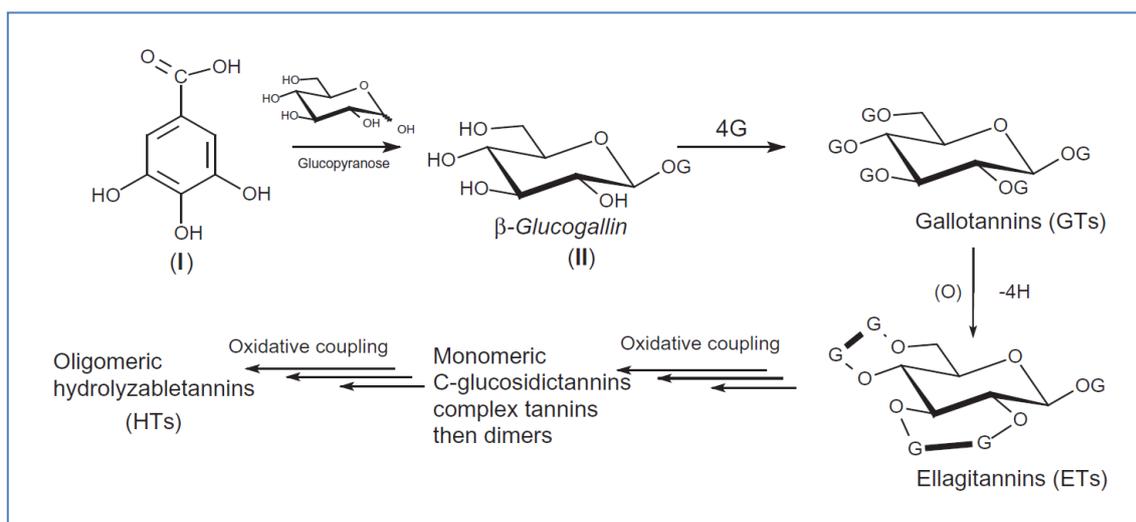


Figura 1.2-4. Clasificación de taninos. Extraída de Khanbabaee y Van Ree, 2001

La síntesis de galotaninos comienza con sucesivas condensaciones de ácido gálico con moléculas de azúcar hasta formar pentagaloil glucosa (PGG) y los elagitaninos por condensación de dos moléculas galoyloil adyacentes (Figura 1.2-5). Las unidades de ácido gálico se sintetizan a partir de la oxidación del ácido cumárico a ácido cinámico que sufre posteriormente una beta oxidación (revisión Shahat y Marzouk 2013). Los galotaninos son los taninos más simples y si bien, generalmente están unidos a D-glucosa también pueden unirse a otros azúcares. La molécula D-glucosa

forma enlace éster con los grupos -OH del galotanino y en la mayoría de los casos está en su conformación piranosa en forma alfa o beta. Los grupos -OH pueden estar sustituidos totalmente o de manera parcial, aumentando la cantidad de estructuras posibles. De los taninos hidrolizables caracterizados hasta la fecha los elagitaninos parecen ser los más abundantes, la variabilidad estructural de los mismos se debe a la cantidad de unidades monoméricas y las diferentes tipos de uniones entre ellas, existe evidencia de que el tipo de unión entre monómeros es específico de familias (revisión Khanbabaee y Van Ree, 2001).



**Figura 1.2-5. Esquema de biosíntesis de taninos hidrolizables.** Condensación de moléculas de ácido gálico (I) con glucopiranosas para la formación de galo y elagitaninos. Extraída de Shahat y Marzouk 2013

Los taninos condensados son los más estudiados, caracterizados y usados en la industria. Existen taninos comerciales aislados de corteza de mimosa (*Acacia mearnsii* o *mollissima*) que es usado como adhesivo de madera, adsorbentes de metales y producción de espumas (Tondi y Pizzi, 2009; Ping *et al.*, 2011; Tondi *et al.*, 2013). En la industria de la curtiembre del cuero se usan extractos comerciales de quebracho (*Schinopsis balansae*), si bien no se dispone de mayor información del compuesto bioactivo.

La diversidad estructural que presentan se debe a su grado de polimerización y los patrones de hidroxilación de las unidades flavonoides que los componen. Estas unidades pueden unirse entre sí por enlaces C4-C6 o C4-C8 y pueden además estar unidas a unidades galoil (taninos del tipo A (complejos); figura 1.2-6). Se dividen en varias clases en función del grado de hidroxilación de las unidades que lo forman.

Las más comunes son (epi)-catequinas y (epi)-galocatequinas que forman procianidinas y prodelfininas respectivamente. Existen además proantocianidinas formadas por enlaces dobles entre C2-O-C7 o C2-O-C5 (taninos del tipo B, Figura 1.2.6; revisión Khanbabaee y Van Ree, 2001; revisión Le Bourvellec y Renard, 2012; Naumann *et al.*, 2017)

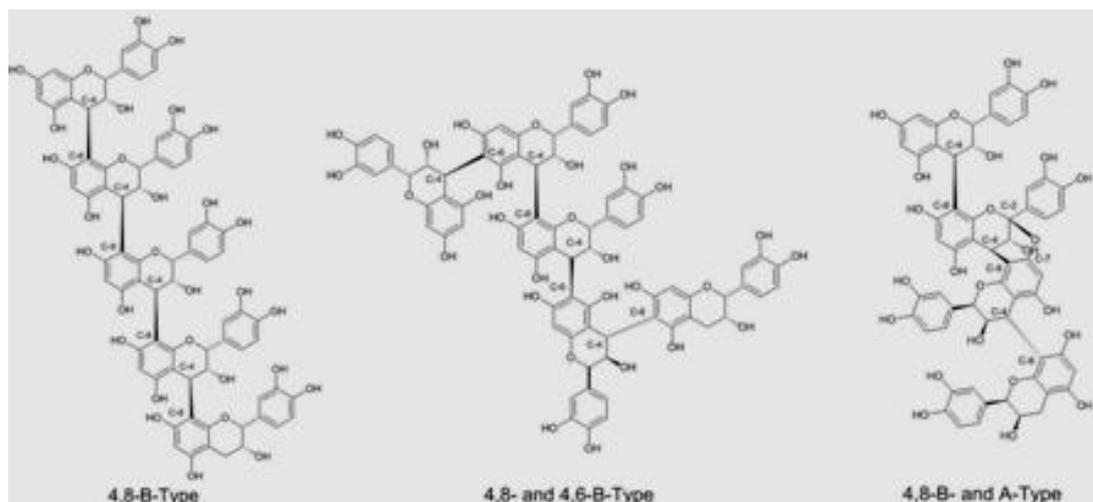


Figura 1.2.6 Diferentes estructuras de taninos condensados. Extraído de Naumann *et al.*, 2017

Tanto taninos hidrolizables como condensados han sido estudiados ampliamente como preservantes de maderas. Se ha demostrado actividad *in vitro* contra variedad hongos de pudrición blanca (*Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus* y *Schizophyllum commune*, *Lenzites betulina*) y marrón (*Coniophora puteana*, *Tyromyces palustris*, *Laetiporus sulphureus*) (revisión Singh y Singh, 2012). Análisis de impregnación de madera de *Pinus sylvestris* L. (pino rojo), con extractos de mimosa y quebracho (Tascioglu *et al.*, 2013) y con soluciones ricas en taninos de tala, castaño, valonia y roble (Tomak y Gonultas, 2018) indican que aumenta considerablemente la resistencia al ataque por hongos de pudrición marrón y blanca. Existen mezclas de taninos con soluciones de boro que, además de aumentar la durabilidad de la madera son retardantes de fuego y mejoran las propiedades mecánicas de la misma (Tondi *et al.*, 2012; Tondi *et al.*, 2015).

Un aspecto a tener en cuenta para el desarrollo de preservantes basados en extractivos es la poca retención en las maderas tratadas, es decir que sean fijados eficientemente (Schultz y Nicholas, 2002). En algunos casos para aumentar la

retención y fijación se han empleado aditivos como el cloruro ferroso (Mitchell y Sleeter, 1980), sales metálicas (Lotz, 1993), aminas cuaternarias (Hwang *et al.*, 2007). En 2006 Glassel y Mellema patentaron un producto compuesto de extractivos fenólicos combinados con aceites y polímeros de silicona que, además de ser efectivo contra hongos degradadores de madera, era repelente al agua y por lo tanto se fijaba eficientemente. Recientemente Tondi y colaboradores (2017) han mejorado las formulaciones en los preservantes con el agregado de poliaminas que aumentan el grado retención cuando la madera se expone al agua.

### 1.2.3. Mecanismos de acción

El estudio de los efectos de los compuestos fenólicos sobre los microorganismos blanco data desde hace aproximadamente 50 años, si bien aún no se ha podido aclarar en profundidad los mecanismos exactos. Sus propiedades antimicrobianas se deberían a la interacción de los grupos hidroxilos con ácidos nucleicos y proteínas; y a la capacidad de quelación del hierro y otros metales de transición cofactores de enzimas microbianas (revisión Martínez-Florez *et al.*, 2002).

La actividad antimicrobiana depende de las características estructurales de los compuestos fenólicos que se relacionan con los sustituyentes en los anillos del esqueleto, con el arreglo espacial de los mismos y con el grado de polimerización de los compuestos. Se ha observado que los -OH en la posición 5 y 3 en el anillo A potencian la deslocalización de los electrones del anillo B aumentando la capacidad antioxidante (revisión Cushnie y Lamb, 2005). En un estudio en el que se relacionó la actividad con la estructura del compuesto fenólico se observaron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana en función de la cantidad de oxígenos y la posición de los mismos en el anillo cuando se exponían al hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor* y al de pudrición marrón *Coniophora puteana* (Voda *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción mejor estudiado es la astringencia, es decir, la capacidad unirse y de precipitar proteínas, mecanismo responsable de la inhibición de enzimas microbianas (Scalbert, 1992). Se ha observado que la adición de polisacáridos iónicos como pectina, ácido poligalacturónico, dextran sulfato o BSA, con afinidad a

taninos y por lo tanto, capaces de competir con las proteínas microbianas disminuyen el efecto inhibitorio (de Freitas *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006). La capacidad de formar complejos con proteínas se debe a que los taninos son ligandos polidentados que tienen gran cantidad de sitios de unión provenientes de sus anillos fenólicos y grupos hidroxilo. Esto les permite formar interacciones estables con los grupos sulfhidrilo y carboxilo de la proteína. Esta unión depende del tamaño, la flexibilidad, grado de polimerización y de hidroxilación, que aumentan el número de sitios capaces de interactuar con las proteínas y por lo tanto la capacidad de unión y precipitación (revisión Le Bourvellec y Renard, 2012). La unión tanino-proteína puede ser reversible (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals) o irreversible, a través de la formación de enlaces covalentes. Estas últimas se dan cuando los fenoles son oxidados a quinonas en la presencia de oxígeno en medio básico. La capacidad astringente depende además del tipo de proteína, aquellas con mayor cantidad de residuos básicos, ricas en prolinas y altamente hidrofóbicas tienen más tendencia a formar complejos con taninos (Simon *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2005). Se ha observado que esta tendencia también depende de los factores postraduccionales, por ejemplo la beta-glucosidasa de *Aspergillus niger* es más resistente a los compuestos fenólicos en comparación a la de *Trametes reesei*, probablemente por variaciones en glicosilaciones (Ximenes *et al.*, 2011).

A diferencia de los taninos, los compuestos fenólicos de bajo peso molecular pueden actuar en sitios específicos de proteínas. Los flavonoides, son capaces de actuar sobre enzimas oxidoreductasas de microorganismos compitiendo con los cofactores FAD y NAD, por su similitud estructural y funcional (ciclos de oxidación/reducción). Estudios de *docking* han revelado que el flavonoide medicarpina aislada del duramen de *Dalbergia congestiflora* inhibe a la lacasa de *Trametes versicolor* uniéndose directamente al sitio T1 de la enzima, impidiendo la reducción de O<sub>2</sub> necesario para la actividad (Martínez-Sotres *et al.*, 2012, 2015). Estudios con precursores radiactivos permitieron observar la inhibición de la síntesis de ADN y ARN cuando se expuso a células de *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus* a extractos ricos en flavonoides. Los autores sugieren que el anillo B de los flavonoides se intercala en el ADN para desestabilizar la estructura (Mori *et al.*, 1987). Estudios

más recientes indican que existe una unión de los flavonoides a la girasa de ADN de *E. coli* y que esta capacidad se vincula con el grado de hidroxidación del anillo B (Ohemeng *et al.*, 1993; Plaper *et al.*, 2003). Análisis en liposomas con sondas fluorescentes permitieron determinar cambios sobre estructuras, polarización y fluidez de membranas y particularmente sobre la enzima citocromo *c* reductasa en células de *E. coli* (Haraguchi *et al.*, 1998).

Como ya se mencionó, las enzimas fúngicas responsables de la degradación de la madera producen especies reactivas del oxígeno para oxidar lignina. El potencial antioxidante que poseen taninos y flavonoides les permite interferir con el estado de transición interceptando a los intermediarios radicales libres. Además, los taninos, son capaces de actuar como agentes quelantes de los metales cofactores enzimáticos (hierro, cobre, zinc, manganeso) que forman complejos estables con los grupos o-difenol. En estudios sobre enzimas extracelulares de hongos degradadores de madera se observó que enzimas peroxidasas y lacasas (dependientes de hierro y cobre) son inhibidas más fuertemente por taninos que pectinasas y xilanasas que no poseen cofactores metálicos (Scalbert, 1991; revisión Valette *et al.*, 2017). Este modo de defensa contra microorganismos es usado comúnmente por animales, un ejemplo es la lactoferrina presente en la leche de mamíferos.

Por último, se propone que los compuestos fenólicos causan daños en membranas y paredes celulares de microorganismos. Limn y colaboradores (2006) observaron por microscopia electrónica los cambios producidos en células de *C. albicans* cuando se expone a extractos de taninos de *Rhizophora apiculata*. A las 24 horas de exposición la pared celular y membrana plasmática sufren alteraciones (invaginaciones) y luego de las 36 horas se produce el colapso de estas estructuras y lisis celular. La disrupción de la membrana también fue observada por Yong y colaboradores (2014) en bacterias gram positivas y gram negativas cuando se los enfrentaba a extractos de plantas medicinales. Los autores pudieron constatar por métodos de espectroscopia de masas, que las principales proteínas afectadas se relacionaban con la síntesis de la pared y membrana celular. En hongos filamentosos se observó que extractos de compuestos fenólicos alteraban el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Alternaria solani* por la inhibición de la síntesis de  $\beta$ -glucanos que conlleva a una lisis de la pared celular (Piotrowski *et al.*, 2015). En el

basidiomicota *Lactarius sulphureus* se observó un colapso en la formación de hifas y clamidosporas cuando se expuso a  $\beta$ -tujaplicina (Yen *et al.*, 2008) y en trabajos posteriores la formación de poros en la membrana que provocaron cambios en la osmolaridad y colapso celular (Choi *et al.*, 2012). Cray y colaboradores (2015) proponen que la integridad de las membranas se ve afectada por las interacciones hidrofóbicas con los compuestos fenólicos que esto induce estrés oxidativo y peroxidación lipídica.

#### 1.2.4. Métodos de extracción y análisis

Las propiedades de los extractos fenólicos dependen del tipo de moléculas bioactivas presentes. Esta composición está estrechamente relacionada, además de con el tipo de tejido utilizado, con el método de extracción. En este sentido todavía hoy no está claro cuál es el mejor método para obtener muestras ricas en un compuesto dado, aunque es sabido que depende de la polaridad de los solventes empleados. Se han utilizado diferentes procedimientos con solventes orgánicos, aceites, soluciones acuosas alcalinas, ácidas, etc. Hayouni y colaboradores (2007), por ejemplo, reportaron que mezclas de agua con solventes orgánicos en diferentes proporciones afectaban el contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos a partir de frutas de *Quercus coccifera* L. y *Juniperus phoenicea* L. Comúnmente se han utilizado solventes alcohólicos como metanol y etanol, que arrojan buenos rendimientos, y mezclas de alcoholes y agua han demostrado ser más eficientes que los solventes puros (Pinelo *et al.*, 2005; Yilmaz y Toledo, 2006). Además de los solventes, el contenido del extracto depende del método utilizado: maceraciones, infusiones, extracciones por reflujo, Soxhlet, microondas, etc. (Sirmah *et al.*, 2009; Naima *et al.*, 2015). El método de extracción a utilizar, entonces, debe ser seleccionado en función de los resultados esperados: concentración de compuestos, actividad antimicrobiana, pureza, rendimientos, etc. Independientemente del método y por las características de los compuestos fenólicos, es recomendable que durante el proceso la muestra no sea expuesta a la luz directa ya que son fácilmente oxidables en estas condiciones (Okuda *et al.*, 1989).

Una vez obtenido el extracto los métodos más sencillos y más utilizados para determinar el contenido de compuestos en una mezcla son los espectrofotométricos. El método utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos totales en productos vegetales es el método de Follin-Ciocalteu que se basa en la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu que contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al reaccionar con los fenoles, es reducido, dando lugar a un complejo de color azul intenso que se mide a 765 nm. La cuantificación de taninos condensados se realiza comúnmente con el test de BuOH/HCl (Scalbert, 1992). Este método se basa en la despolimerización en medio ácido de los taninos condensados que originan antocianidinas, compuestos coloreados que pueden ser cuantificados espectrofotométricamente. Los taninos hidrolizables se detectan por el test de  $KIO_3$ , descrito por Haslam en 1965 y modificado por Bate y Smith en 1977; la sal reacciona con esterés galoil formando un intermediario coloreado que se detecta a 550 nm. Si bien este método se usa para determinar el total de taninos hidrolizables, puede subestimar la cantidad de elagitaninos, donde las unidades galoil no están libres para reaccionar con la sal. Los flavonoides se cuantifican por la formación de complejos coloreados entre los hidroxilos fenólicos del grupo ceto de los flavonoides con sales de aluminio cuya absorbancia se mide a 434 nm.

Es importante destacar que estos métodos colorimétricos son usados de manera semi-cuantitativa, permiten comparar entre muestras y analizan grandes grupos químicos y no compuestos individuales. Para profundizar en el estudio de mezclas complejas, desde el comienzo del siglo XX se han desarrollado métodos de separación y técnicas analíticas como las cromatografías (HPLC, GC, CPC), espectroscópicas (MS, IR, FTIR), de resonancia magnética nuclear (RMN, 2D RMN) y las combinaciones de estas (GC/MS, HPLC/MS, LC/MS-NMR, etc), que han permitido la caracterización de una gran cantidad de compuestos, incluso con estructuras complejas de gran tamaño y poca estabilidad (Whiting, 2001).

Una de las técnicas más utilizadas para la caracterización de extractos ricos en compuestos fenólicos provenientes de madera es la de espectroscopia de masa MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) (Navarrete *et*

*al.*, 2010; Priyanka *et al.*, 2014; Konai *et al.*, 2017; Bi Athomo *et al.*, 2018). Esta técnica puede ser utilizada en cualquier muestra que pueda ser vaporizada en vacío, como lo son la mayoría de los compuestos orgánicos. Permite determinar los grados y patrones de oligomerización en macromoléculas de hasta 300000 Da con pequeñas diferencias. Se obtiene un espectro de masa que relaciona la intensidad de la señal de cada ión con un valor  $m/z$  que permite determinar el peso molecular y relacionarlo con la estructura de compuestos desconocidos, o confirmar la presencia de moléculas que se sospecha pueden estar en la muestra analizada (Niessen y Falck, 2015). Esta técnica generalmente se complementa con estudios de RMN que permiten dilucidar estructuras químicas de los compuestos analizados.

Todos estos avances son herramientas fundamentales para profundizar en el desarrollo de productos ambientalmente amigables con potencial como preservantes de madera. Sin embargo, remplazar completamente el CCA tomará tiempo y será necesario aumentar los esfuerzos en la investigación y formulación de productos y métodos de aplicación estandarizados que sean efectivos tanto *in vitro* como en ensayos de campo.

# Objetivos

---

## Objetivo general

El constante desarrollo de resistencia por parte de algunos microorganismos a los agentes utilizados en la actualidad ha estimulado la búsqueda de antimicrobianos alternativos. Las plantas han desarrollado, durante el curso de la evolución, diferentes estrategias que le han conferido la capacidad de sobrevivir al ataque de patógenos de diversos tipos. Desde tiempos remotos son una fuente interesante para la búsqueda de nuevas moléculas y dado que la flora uruguaya ha sido poco estudiada es una fuente interesante para la búsqueda de agentes que no generen resistencia y sean activos contra una amplia gama de microorganismos.

Como aporte a esta línea de investigación nos planteamos el siguiente objetivo:

- Identificar agentes antimicrobianos naturales de la flora uruguaya con actividad contra diferentes tipos de patógenos.

## Objetivos específicos

### **Péptidos antimicrobianos (AMPs).**

El alto potencial de los AMP vegetales como agentes terapéuticos en agricultura y en medicina, ha estimulado su búsqueda, caracterización y síntesis/producción. Nos proponemos entonces:

- Identificar y caracterizar defensinas de dos especies de la flora nativa *Peltophorum dubium* (ibirapitá) y *Maytenus ilicifolia* (congorosa) a partir del análisis por ARNseq.
1. Validar secuencias identificadas en transcriptomas.
  2. Producción de uno de los péptidos en dos sistemas de expresión en *E. coli* para evaluar mejores condiciones de producción

3. Analizar la actividad antimicrobiana.

## Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos han demostrado ser parte fundamental en la durabilidad natural de maderas por su acción contra hongos xilófagos. Nos proponemos entonces:

- Obtener de la madera de la planta invasora con alta durabilidad natural *Gleditsia triacanthos L.* extractos ricos en compuestos fenólicos que puedan ser la base para el desarrollo de preservantes naturales de madera.
1. Seleccionar el método de extracción en función de la actividad contra hongos xilófagos
  2. Cuantificar extractos en función de grupos químicos
  3. Relacionar actividad con componentes presentes en los extractos.

# Capítulo 2

## Resultados AMPs

---

## 2.1 Defensinas de ibirapitá y congorosa

---

El análisis de transcriptomas de plantas es una estrategia para alcanzar el objetivo de nuestro grupo de trabajo de encontrar péptidos antimicrobianos con actividades novedosas. Con el objetivo de identificar nuevos AMPs de origen vegetal, se analizó el transcriptoma de semilla germinada de las especies nativas *Maitenus ilicifolia* (congorosa) y *Peltophorum dubium* (ibirapitá). Los datos de ambos transcriptomas fueron depurados y ensamblados por separado mediante diferentes herramientas como Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), Trinity (Grabherr *et al.*, 2011), Transrate (Smith-Unna *et al.*, 2016) y GetOrf (Rice *et al.*, 2000), en colaboración con el Dr. Pablo Smirich, Facultad de Ciencias. Se obtuvieron 87 secuencias que fueron categorizadas en los diferentes grupos de AMPs: - en Congorosa 15 tipo Snakin/GASA, 10 tipo defensina y 14 proteínas de transferencia de lípidos; - en Ibirapitá 20 Snakin/GASA, 20 proteínas de transferencia de lípidos y 8 posibles defensinas. En ninguno de los análisis se encontraron ciclótidos o tioninas.

En este trabajo se analizaron los *contigs* categorizados como posibles defensinas, a nivel de secuencia nucleotídica y de péptidos deducidos. Todas las secuencias verificadas fueron clonadas en pGEMT-easy (Promega, Tabla M.2, Materiales y métodos); con cada vector se transformaron células de *E.coli Top10* y se conservaron a - 70°C para generar una biblioteca de genes de defensinas que serán utilizados en futuros trabajos (Tabla M.1, Materiales y métodos).

### 2.1.1. Verificación de secuencias transcriptómicas de *Maitenus ilicifolia* (congorosa)

Las 10 secuencias tipo defensina del transcriptoma ensamblado de congorosa (Tabla 2.1-1) se obtuvieron por homología con dos defensinas de *Arabidopsis thaliana* (UniProtKB Q9FI23 y Q39182). Una vez obtenida la secuencia nucleotídica se dedujeron los péptidos, se corroboró manualmente los marcos de lectura de cada *contig* y que no se repitieran ni existieran combinaciones de los *reads* entre los *contigs* obtenidos. Cada secuencia peptídica se comparó mediante Blastp con proteínas de diferentes bases de datos (UniProtKB/ SwissProt) para determinar si presentaba homología con proteínas anotadas. También se analizó la presencia de péptido señal mediante SignalP (Figura A.1, Anexo 1) y de motivos conservados en defensinas de plantas.

En este análisis se descartó el *contig* MiDN40134 debido a que se trata de un transcripto muy grande (2000 pb) cuyo péptido deducido tipo defensina, está incompleto (37 aminoácidos). Presenta además alta homología con una proteína de *Homo sapiens* (UniProtKB Q96MP5), con una mejor relación entre el tamaño transcripto y la proteína codificada.

Para verificar que los 9 *contigs* restantes existen en la planta y no son un artefacto del ensamblado, se diseñaron *primers* específicos, se realizó una PCR y los productos de amplificación se secuenciaron. La verificación se hizo a partir de ADN genómico lo que permite además, conocer la estructura de los genes (presencia de intrones). Siempre que fue posible los *primers* se diseñaron en las zonas UTR (*UnTranslated Region*).

Se verificaron los *contigs* MiDN6861 y MiDN37676\_121, \_123 y \_124, mientras que los *contigs* MiDN33432\_011, \_012, MiDN27898\_011, \_012 y MiDN56385 no pudieron ser amplificados en las diferentes condiciones ensayadas (*primers*, temperaturas de *annealing*, tiempos de elongación). A continuación se detallan las características de cada secuencia (verificada y no verificada).

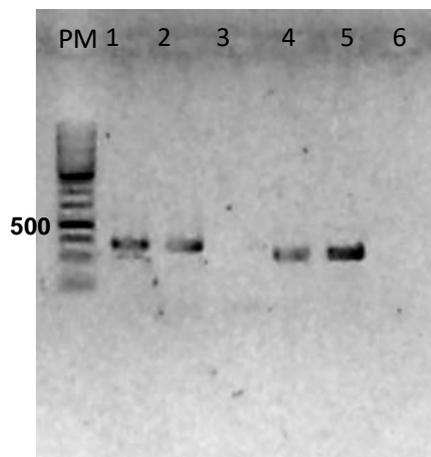
Tabla 2.1-1. Resultados del análisis por Blastp de péptidos deducidos de los *contigs* de congrosa con motivo defensina. Bases de datos SwissProt-UniProt.

Transcripto		Hit Blast SwissProt-UniProt						ID_motivo de Cys *	Motivo Cys
ID_transcriptoma	Largo aa	ID_UniProt	Anotación	Org	% Ident	Covertura aa	E-value		
MiDN6861	73	Q9FFP8	Defensin-like protein 6; AltName: Full=Low-molecular-weight cysteine-rich protein 74	<i>Jatropha curcas</i>	51	52	3.00E-022	DEF35	CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>9</sub> CX <sub>6</sub> CXCX <sub>3</sub> C
MiDN37676_124	75	Q40901	Defensin-like protein 2; AltName: Full=Gamma-thionin homolog PPT	<i>Petunia integrifolia</i>	59	48	9.00E-022	DEF35	CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>9</sub> CX <sub>6</sub> CXCX <sub>3</sub> C
MiDN37676_123	75								
MiDN37676_121	75	-----	-----						
MiDN33432_011	87	POC8Y4	Defensin-like protein 1; AltName: Full=Cysteine-rich antimicrobial protein 1	<i>Dahlia merckii</i>	75	48	4.00E-021	DEF32	CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>10</sub> CX <sub>8</sub> CXCX <sub>4</sub> C
MiDN33432_012	87				73	48	2.00E-020		
MiDN27898_011	106	Q07502	Defensin-like protein; AltName: Full=8.4 kDa sulfur-rich protein	<i>Glycine max</i>	48	52	0.002	nd	CX <sub>10</sub> CX <sub>4</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>3</sub> CXCX <sub>3</sub> CX <sub>3</sub> C
MiDN27898_012	96	B3EWP3	Defensin 1; AltName: Full=Allergen: Ara h 12	<i>Arachis hypogaea</i>	43	49	2.00E-005	nd	
MiDN40134	37	DESCARTADO	-----						
MiDN56385	81	Q6K209	Defensin-like protein CAL1; AltName: Full= Pathogen-related protein 12	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	27	74	0.34	nd	CX <sub>11</sub> CX <sub>4</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>3</sub> CXCX <sub>3</sub> CX <sub>3</sub> C

\* Motivo conservado DEF32 : CX{4,25}CX{2,12}CX{3,4}CX{3,17}CX{4,32}CXCX{1,6}C; DEF35 : CX{5,10}CX{4,6}CX{3}CX{9,15}CX{5,12}CXCX{3}C

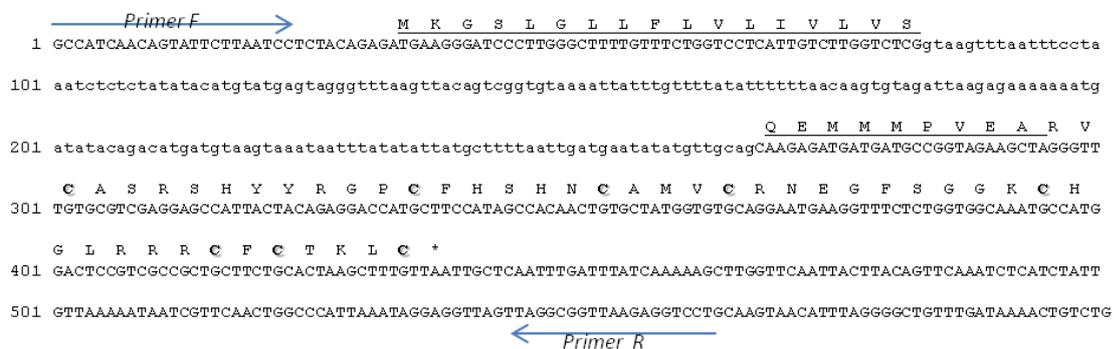
## MiDN6861

El *contig* MiDN6861 codifica, un péptido de 73 aminoácidos con 8 Cys conservadas y un péptido señal de 26 aminoácidos. En la amplificación del ADNg se obtuvo un único amplicón con *oligos* diseñados en las zonas UTR. El tamaño del amplicón fue de aproximadamente 500 pb (Figura 2.1-1), que sería lo esperado considerando el tamaño del transcrito de 380 pb y la presencia de uno o más intrones. La secuencia de amplicón verificó 100% la secuencia obtenida en el análisis del transcriptoma con un intrón de 73pb (Figura 2.1-2).



**Figura 2.1-1. Electroforesis de productos de amplificación de ADNg de Congorosa con primers en UTR 5' y 3'.** 1-3: *contig* MiDN37676; 4-6: *contig* MiDN6861. Tann 60°C, Tann 58°C y blanco sin ADN respectivamente. PM: marcador de peso molecular 1Kb (ThermoFisher®).

La secuencia peptídica de MiDN6861 es del tipo I, es decir que no tiene un C-terminal largo para el almacenamiento en vacuolas (Lay *et al.*, 2012). En el análisis se identificaron algunos residuos conservados, además de las 8 cisteínas, que se cree son importantes para el plegado: glicina 12 y 32 y glutamato 27.



**Figura 2.1-2. Mapa del gen MiDN6861.** Se indica en minúsculas el intrón y en mayúsculas las secuencias transcritas y el péptido deducido. En subrayado se indica el péptido señal y con sombreado las cisteínas conservadas.

Para predecir la estructura tridimensional se realizó el modelado por homología con el programa RaptorX, el mejor modelo se obtuvo utilizando como molde a la proteína DEF4 de *Medicago truncatula* (PDB: 2LR3). El modelo predice una estructura terciaria típica de defensinas de plantas con 3 hojas betas antiparalelas y una alfa hélice. En la conformación se observan puentes disulfuro típicos que estabilizan la estructura: tres en el motivo CS $\alpha$  $\beta$ , Cys2-Cys5, Cys3-Cys6 y Cys5-Cys7; uno entre las dos hojas beta restantes, Cys1-Cys8. El motivo  $\gamma$ -core se ubica en uno de los *loops* (Figura 2.1-3).

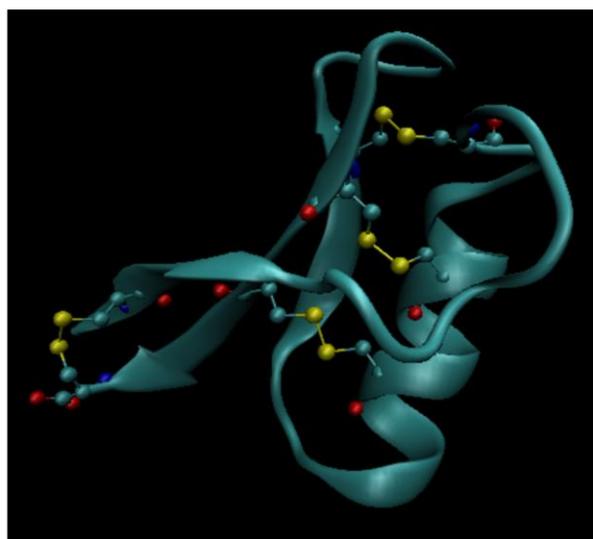
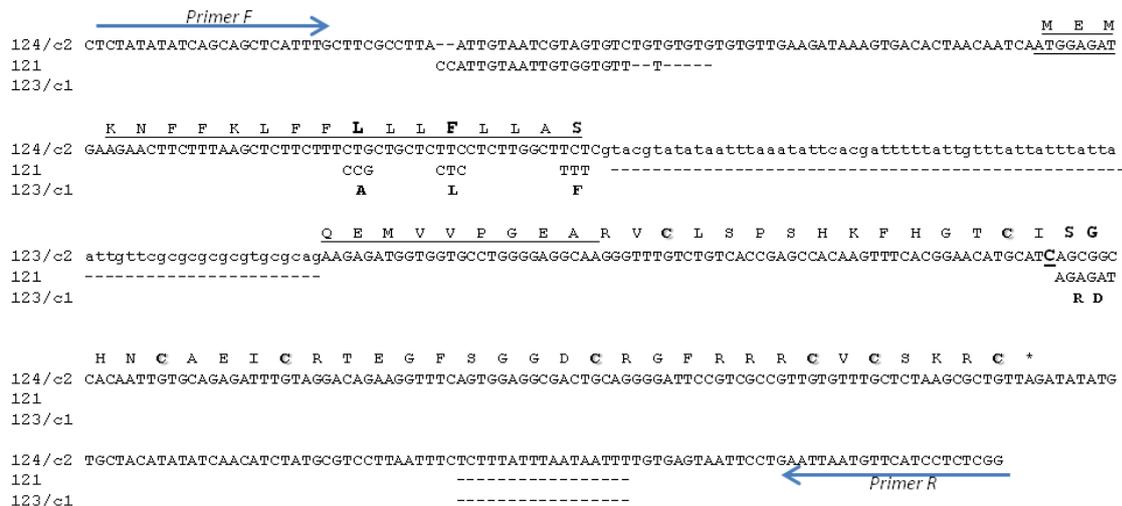


Figura 2.1-3. Modelo del contig MiDf6861 generado por homología con 2LR3 en Raptor X, visualización VMD 1.9.3 (Humphrey *et al.*, 1993). Aparecen representadas Cys y enlaces SS (amarillo).

### **MiDN37676\_124, MiDN37676\_123 y MiDN37676\_121**

MiDN37676\_124, MiDN37676\_123 y MiDN37676\_121 se analizaron juntos por ser muy similares. El alineamiento muestra que las secuencias 123 y 124 son idénticas, excepto en el extremo 3' UTR donde se observa una inserción/delección de 17pb. MiDN37676\_121, es el más distante, las diferencias se encuentran tanto en las regiones UTR como en la secuencia codificante. Se dedujeron entonces, dos péptidos de 75 aminoácidos con 93% de similitud y 5 diferencias (3 en el péptido señal y 2 en el maduro, Figura 2.1-4).

Para verificar la existencia de las tres secuencias en una única reacción de PCR se diseñaron *primers* en las zonas UTR con homología entre los tres *contigs*. El producto obtenido tuvo un tamaño de aproximadamente 500 pb que sería lo esperado considerando el tamaño de los transcriptos (392, 397 y 414pb para MiDN37676\_121, 123 y 124 respectivamente) y la presencia de uno o más intrones (Figura 2.1-1).

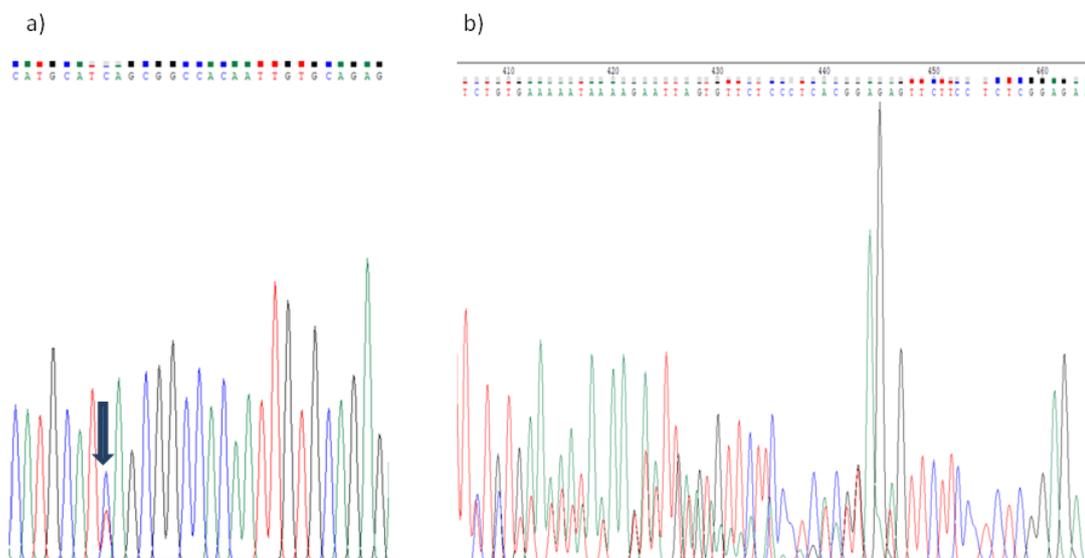


**Figura 2.1-4.** Mapa de secuencias MiDN37676 124/c2,123/c1 y 121. Se indica en minúsculas el intrón y en mayúsculas las secuencias transcritas y el péptido deducido. En subrayado se indica el péptido señal y con sombreado las cisteínas conservadas. De las secuencias \_0123/c1 y 121 solo se indican nucleótidos y aminoácidos diferentes (negrita) a la secuencia 124/c2. Se subraya la cisteína 202.

Una alícuota del amplicón se secuenció y otra se purificó con minicolumnas Wisard (Promega), se clonó por ligación en vector pGEM-Teasy (Promega) y se transformaron bacterias *E. coli Top10*. La presencia del inserto en los clones se verificó por amplificación del ADN plasmídico con *primers* complementarios al vector (pCR21\_ampF1 y pCR21\_ampR1, Tabla M.3, Materiales y métodos), se seleccionaron dos clones positivos que también se secuenciaron. En el alineamiento entre las secuencias de los clones, amplicón y transcriptoma se identificó un intrón de 187 pb, ubicado antes de la secuencia que codifica el péptido maduro. Se verificaron los *contigs* MiDN37676\_123 y MiDN37676\_124 y no la de MiDN37676\_121, aunque la C (Citocina) en la posición 202 (desde ATG) tanto en los clones como el amplicón se corresponde con el *contig* 121. Esta C-202 está en lugar de T (Timina) correspondiente a los *contigs* 123 y 124, no modifica la secuencia peptídica (Figura 2.1-4).

En el cromatograma del amplicón, se observa una secuencia única salvo en esta posición donde se ve el solapamiento entre C y T (Figura 2.1-5a), y al final donde se solapan dos secuencias debido al desfase producido por los 17 pb presentes en el *contig* 124 y ausentes en el *contig* 123 (Figura 2.1-5b). El único indicio de la existencia del *contig* MiDN37676\_121 sería la ocurrencia de la C-202 mencionada arriba y este cambio no es significativo ya que puede deberse a una mutación durante la amplificación. La evidencia más fuerte de que la secuencia 121 no está en planta es que no se observaron diferencias a nivel de intrón. Sería esperable que las variaciones de secuencias se acumulen a nivel del intrón y en UTRs con mayor frecuencia que a nivel de secuencia codificante, todo lo contrario sucede en este caso.

Los clones secuenciados verificaron los *contig* MiDN37676\_123 (clon 1) y MiDN37676\_124 (clon 2), como dos *loci* idénticos a nivel de exones e intrón, y por lo tanto codifican péptidos idénticos, que se diferencian en 17 pb en la zona 3'UTR (Figura 2.1-4, Tabla M.1).



**Figura 2.1-5** Secciones de cromatograma del amplicón de los *contigs* MiDN37676. a) La flecha indica el solapamiento de bases C/T posición 202 (ADNg). b) Zona final donde se observa solapamiento de dos secuencias producida por la inserción/delección de 17 pb en 3'UTR.

## MiDN56385 y MiDN27898

El *contig* MiDN56385 tiene una estructura primaria típica de defensina, con un péptido deducido y péptido señal de 81 y 21 aminoácidos respectivamente (Figura 2.1-6a). La defensina madura deducida presenta 10 Cys organizadas en un motivo CX<sub>11</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>5</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>CXCX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>C que no ha sido descrito hasta la fecha en la bibliografía consultada (Tabla 2.1-1).

Los *contigs* MiDN27898\_011 y MiDN27898\_012 codifican péptidos similares (87% de identidad). Las diferencias se encontraron en la zona correspondiente al péptido señal. MiDN27898\_012 parecería estar incompleto en 5' ya que no se encontró el codón iniciador ATG, además en esta zona aparece un codón STOP (Figura 2.1-6b). Los péptidos maduros presentan 10 Cys organizadas en un motivo CX<sub>10</sub>CX<sub>4</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>5</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>CXCX<sub>3</sub>CX<sub>3</sub>C. El sitio de corte del péptido señal es el mismo en ambos *contigs* pero el tamaño es de 19 y 12 aminoácidos para MiDN27898\_011 y MiDN27898\_012 respectivamente. Una primera interpretación indicaría que MiDN27898\_012 sería un artefacto del ensamblado.

Ambos *contigs* se modelaron por homología con el programa RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu>), como una aproximación para predecir el efecto de las dos cisteínas “extras” en la estructura y determinar si ajustan a estructuras similares a PhD1 de *Petunia hybrida* (única defensina cristalizada hasta la fecha con cinco enlaces SS) ó, a estructuras típicas de defensinas con 8 Cys que forman cuatro enlaces SS.

El molde utilizado por el programa con mejores valores de GDT (*Global Distance Test*) para ambos péptidos fue la defensina TPP3 de *Solanum lycopersicum* que tiene 8 cisteínas y el motivo CS $\alpha$  $\beta$  típico, estabilizado por cuatro puentes disulfuro (Cys1-Cys8, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6, Cys4-Cys7). El modelo de MiDN27898 se ajusta a esta estructura típica (valor de GCT de 43), con cuatro puentes disulfuro formados por las Cys que están en posiciones equivalentes a las del cristal. Las cisteínas supernumerarias Cys4' y Cys8', nombradas por su ubicación respecto a las cisteínas de posiciones conservadas en los alineamientos, Cys4 y Cys8 respectivamente, no forman enlace (Figura 2.1-7a).

a) MiDN56385

M M I L K V T A

1 ATTACAACAATTTTCTCCTTCTTTCTTTCTCGATTCTTCACTCTTTACATCCATACCCGGTCACAAGCATCAACAAC**ATG**ATGATACTGAAAGTCACCGCT

L T F L L V I P G I Y S G Q N G T A G N R D K I C T A A S R T Y D

101 CTAACCTTTTCTGCTGGTGATTCAGGAATCTACTCTGGGCAAAATGGCACAGCCGGAAACCGTGATAAAATATGCACTGCAGCAAGCAGGACATACGACG

D P T C T S N P C S S A C K N E N F C T G M C T P K C T C A K F C N

201 ATCCGACGTGCACCTCAAACCCATGCTCAAGCGCCTGCAAAAATGAAAATTTTGGCACTGGGATGTGCACCTCCAAGTGCACCTGCCTAAGTTTGTAA

R A C G S V \*

301 CCGTGCCTGTGGGAGTGT**GTG**ATGAGGCTATCCTTTGATGAATATGCAATATAAACTAGATAATATGACACCTCTCTGTGTGTTTTAGTGTTTTATGTGT

401 GTGTTTTAGTGTTTTATGTGTGTGTTTTAGTGTTTTATGTG

b) MiDN27898\_11 y MiDN27898\_12

M A S V L R V I A L L L L L L A A E A R I A E I S G S A

011 CTCGAATTTAAGGTATA**ATG**GCTTCAGTTCACGTGTTCATAGCTTTACTTTTGGCTCTTACTTGCAGCTGAGGGCAGAAATGCAGAAATTTCTGGCTCTGCG

012 TCTCAATTTAAGGTATAACT

S Q F \* G I T

Y D S G T G T G T G I E S G T E T G T G T G I M E T Q E K I C R K

011 TATGACTCTGGGACCGGAACCTGGAACCGGAATCGAGAGTGGAACTGAGACTGGGACTGGGACTGGCATAATGGAACTCAAGAAAAATATGCAGAAAA

012 -----

V S K T Y P E R C L S N A C T V A C K N E G F C S G A C K E K C I

011 GTCAGCAAGACGTATCCTGAGAGATGCCTGTCAAAATGCATGCCTGTGGCCTGCAAAAACGAAGTGTGTCAGCGGGCTTGCAGAAAGAAAGTGCATAT

012 GAG CGTGGG GAAGCA

E R G E A

C · T K I C N R A C G S V \* ·

011 GCACATAAATCTGCAACCGTGCATGTGGTAGTGT**GTG**ACCCTGATGTATGGTGGGCTCTTCTGTAATGAATATGTAATAAAAAGAAGCATGTGTTT

012

011 TCAAACTCTTTGTTCCCTCTTTCTGATCTATCTAATGGAATCTAGACTTTGCTTTGGTATCTATCTCTGTTCCCTCTTTGATTTATAAAATGGATGT

011 ACTAATCTTATTATATATATAATATATATAAATCATAACAAATTACATGGGT

c) MiDN33432\_11 y MiDN33432\_12

M A A K A L K L G F F L A I F C I L A L V A N S D A E V I

011 CGTAAGAGAAAAACATGGCAGCTAAAGCTCTCAAACCTCGGTTTCTTCTTAGCTATTTTCTGCATCCTTGGCTCTTGTAGCGAACCTCAGATGCAGAAAGTAT

P E E V I P A A L C E K A S Q T W S G G C K I T S H C D K Q C R D

011 ACCTGAAGAAGTGATACCTGCAGCACTGTGTGAGAGGGTCAAGCCAGACATGGTCAAGTGGATGTAAGATAACATCACACTGTGACAAGCAGTGCAGAGAT

012 T C

W E H A E H G A C H V R G G K H M C F C Y F K S C \*

011 TGGGAGCATGCAGAGCATGGTGTCTAT**GTTC**GAGGGGGTAAACACATGTGCTTCTGCTACTTCAAAAGTT**GTG**ATCATC-----

012 C A AC C **GTC**ACTTCAAAAGT**GT**

T

011 -GTCATCATCATATGTGCATCCTCAACCACCATCATCAAGAACTAAACCAGTCAATAATAATGCATGCTTTCTTGTAAACGCTTGAATAGTGTATACTA

012 **GA** G A T T

011 TTCATGCTGTCTACTTGTACTACTAGTCTAGTACAACCTTAAATTAATGAAGAAATAACGTGTGTTGTTTTATATATCTCTGATGCATATTGGATCGTTT

011 ACGGTATTATTATATGATCTTTATTATGCCATAATTTAATCGAA

Figura 2.1-6. Mapa de *contigs* de congorosa comparados mediante alineamiento de las secuencias nucleotídicas y peptídicas . En subrayado se indica el péptido señal y con sombreado las cisteínas conservadas. a) MiDN56385. b) MiDN27898\_011 y \_012 . c) MiDN33432\_011 y \_012. De las secuencias \_012 solo se indican nucleótidos y aminoácidos diferentes (negrita) a la secuencia \_011.

En el modelo de MiDN56385 se observa el motivo CS $\alpha$  $\beta$  típico y únicamente 3 puentes disulfuro (Cys1-Cys8, Cys3-Cys6, Cys4-Cys7). El enlace Cys2-Cys5 no se forma, y las cisteínas supernumerarias Cys4' y Cys8' no forman enlace (Figura 2.1-7b). Este modelo presenta un GDT bajo (28), indicando que la semejanza con

secuencias con estructura reportada es insuficiente para generar un modelo confiable por homología. El hecho de que los modelos (MiDN27898, MiDN56385) no se ajusten a la estructura de Phd1 (5 enlaces SS), era esperable dado que las cisteínas extra se encuentran en diferentes posiciones de la secuencia aminoacídica: Cys1' y Cys3' en Phd1 y Cys4' y Cys8' en MiDN27898, MiDN56385 (Figura 2.1-12). Para determinar si se tratan de defensinas novedosas mayores esfuerzos deben hacerse para clonar estas secuencias, analizar su actividad y la relevancia de las 10 cisteínas en el mantenimiento de la estructura y función.

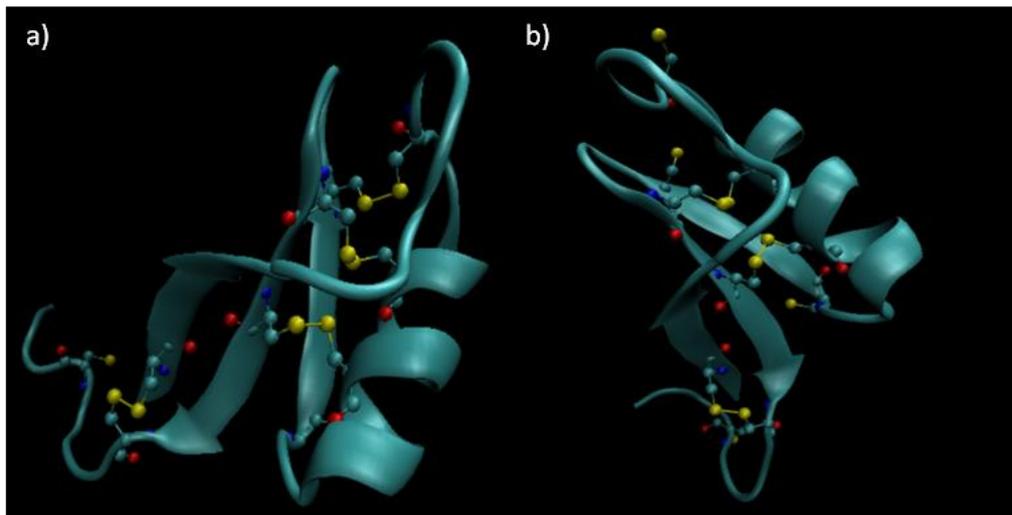


Figura 2.1-7. Modelos por homología con 4UJO de *contigs* de congorosa con 10 Cys, generados en Raptor X, visualización VMD 1.9.3 (Humphrey *et al.*, 1993). Aparecen representadas Cys y enlaces SS (amarillo) a) MiDN27898\_011. b) MiDN56385

### MiDN33432

MiDN33432\_011 y MiDN33432\_012 tienen 94% de identidad, la mayor diferencia es en la 3'UTR donde existe una inserción/delección de 18 pb. El péptido deducido es idéntico para ambos *contigs*, excepto en la valina 73 que cambia a treonina en MiDN33432\_012 (Figura 2.1-6c). La defensina madura presenta 8 Cys conservadas. En todo el resto de la secuencia nucleotídica, las diferencias en la zona codificante se encuentran en la tercera posición del codón. Queda para trabajos futuros determinar si realmente existen ambos péptidos en la planta.

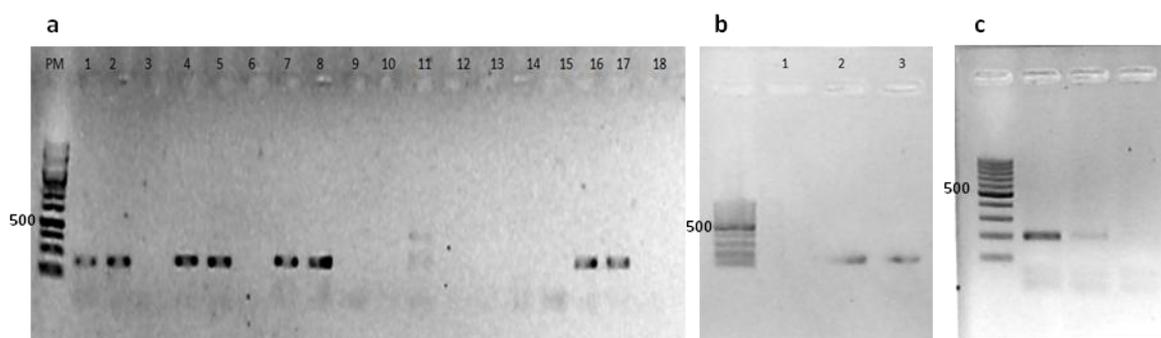
## 2.1.2. Verificación de secuencias transcriptómicas de *Peltophorum dubium* (ibirapitá)

Del transcriptoma de ibirapitá se obtuvieron 8 secuencias tipo defensinas por homología con las mismas proteínas utilizadas en congorosa (Sección 2.1.a). El análisis de los *contigs* se realizó de la misma manera, chequeando manualmente los péptidos deducidos (Tabla 2.1-2), las secuencias nucleotídicas y el péptido señal (Figura A.2, Anexo 2).

En una primera instancia se diseñaron *primers* en regiones UTR específicos para cada *contigs* (Tabla M.3, Materiales y métodos), que se usaron para amplificar a partir de ADNg.

### PdND60561, PdND64469, PdND8737

Los productos obtenidos se secuenciaron y permitieron verificar estos *contigs*, revelando la presencia de un intrón en cada gen (122pb, 127pb, 103pb) (Figura 2.1-8a). Los péptidos deducidos presentan un péptido señal de longitud variable, seguido de un péptido maduro con 8 Cys en motivo CX<sub>5-10</sub>CX<sub>4-6</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>9-15</sub>CX<sub>5-12</sub>CXCX<sub>3</sub>C (DEF35, clasificación según Slavokhotova *et al.*, 2015; Figura 2.1-10 a,b,c; Tabla 2.1-2).



**Figura 2.1-8. Electroforesis de productos de amplificación de ADNg de Ibirapitá.** a) Amplicones con *primers* en UTR 5' y 3'. 1-3: PdND60561. 4-6: PdND64469. 7-9: PdND8737. 10-12: PdDN18833. 13-15: PdDN11865. 16-18: PdND24034\_011 y 012. En cada caso Tann 60°C, Tann 58°C y blanco sin ADN. PM. Marcador de peso molecular 1Kb (ThermoFisher®). b) Amplicones PdND18833 con *primer forward* en péptido maduro. 1: blanco, 2-3: Tann 58°C y 56°C. c) Amplicones PdDN14712 con *primer forward* en péptido maduro. 1-2 Temperatura de annealing 58°C y 56°C; 3: blanco. Marcador de peso molecular 100 pb (ThermoFisher®).

**Tabla 2.1-2.** Resultados del análisis por Blastp de péptidos deducidos de los *contigs* de ibirapitá con motivo defensina. Bases de datos SwissProt-UniProt.

Transcripto		Hit Blast SwissProt-UniProt						ID_motivo de Cys*	Motivo Cys
ID_transcriptoma	Largo aa	ID_UniProt	Anotación	Org	% Ident	Covertura Aa	E-value		
PdDN24034_011	84	P82787	Defensin-like protein 19; AltName: Full-Defensin AMP1 protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	55	77	2.00E-28	DEF35	CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>10</sub> CX <sub>8</sub> CXCX <sub>3</sub> C
PdDN24034_012	83				54	78	7.00E-27	DEF35	CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>10</sub> CX <sub>8</sub> CXCX <sub>3</sub> C
PdDN60561	77	Q40901	Defensin-like protein; AltName: Gamma-thionin homolog PPT	<i>Petunia integrifolia</i>	68	77	3.00E-64	DEF35	CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>10</sub> CX <sub>8</sub> CXCX <sub>3</sub> C
PdDN18833	84	Q40901	Defensin-like protein; AltName: Gamma-thionin homolog PPT	<i>Petunia integrifolia</i>	62	78	7.00E-029	DEF35	CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>10</sub> CX <sub>8</sub> CXCX <sub>3</sub> C
PdDN64469	74	Q9FFP8	Defensin-like protein 6; AltName: Low-molecular-weight cysteine-rich protein 74	<i>Arabidopsis thaliana</i>	58	74	1.60E-016	DEF35	CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>10</sub> CX <sub>8</sub> CXCX <sub>3</sub> C
PdDN8737	73	Q9FFP8	Defensin-like protein 6; AltName: Low-molecular-weight cysteine-rich protein 74	<i>Arabidopsis thaliana</i>	58	73	2.00E-026	DEF35	CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>10</sub> CX <sub>8</sub> CXCX <sub>3</sub> C
PdDN14712	72	B3F051	Defensin Lc-def; Flags: Precursor	<i>Lens culinaris subsp. culinaris</i>	56	72	3.00E-021	DEF32	CX <sub>10</sub> CX <sub>8</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CXCX <sub>3</sub> C
PdDN11865	89	P18646	Defensin-like protein; AltName: 10 kDa protein	<i>Vigna unguiculata</i>	46	76	7.00E-015	DEF32	CX <sub>10</sub> CX <sub>8</sub> CX <sub>3</sub> CX <sub>10</sub> CX <sub>5</sub> CXCX <sub>3</sub> C

\* Motivos conservados DEF32 : CX{4,25}CX{2,12}CX{3,4}CX{3,17}CX{4,32}CXCX{1,6}C; DEF35 : CX{5,10}CX{4,6}CX{3}CX{9,15}CX{5,12}CXCX{3}C



No se obtuvieron indicios de la existencia de la secuencia PdDN24034\_012, se podría secuenciar el producto de PCR sin clonar y buscar si existen zonas o bases superpuestas en el cromatograma, a fin de eliminar cualquier sesgo que pudiera haber ocurrido en la etapa de clonado.

### **PdDN18833 y PdDN11865**

Con *primers* situados en las secuencias UTR no se obtuvo amplificación de los *contigs* PdDN18833 y PdDN11865 en ninguna de las condiciones de reacción ensayadas (diferentes temperaturas y tiempos de elongación). Por lo tanto se diseñaron nuevos *primers*, esta vez en la secuencia codificante: *primers F* en inicio del péptido maduro y *primers R* hasta el codón STOP. Con estos *primers* se amplificó la secuencia correspondiente al *contig* PdDN18833 con un amplicón de tamaño similar al esperado (143 pb) ya que no existe intrón en esta zona (Figura 2.1-8b). La secuencia se verificó en un 100% (Figura 2.1-10d). No se obtuvo amplificación para el *contig* PdDN11865 (Figura A.3, Anexo 3)

### **PdDN14712**

Este *contig* parecería no estar completo en 5' ya que no existe codón iniciador (ATG), por lo que directamente se buscó verificar solamente las secuencias correspondiente a péptido maduro. El *primer F* se diseñó al inicio del péptido maduro y el *primer R* al final incluyendo el codón STOP. El producto de amplificación tuvo un tamaño similar al esperado (205 pb) (Figura 2.1-8c). La secuenciación del amplicón corroboró en un 100% la secuencia del péptido maduro obtenida en el ensamble (Figura 2.1-10e).



### 2.1.3. Análisis global de secuencias

La amplificación a partir de ADNg permitió verificar las secuencias del péptido maduro de 9 defensinas deducidas por análisis del transcriptoma, validando la existencia de estas moléculas en las plantas respectivas. A nivel genómico se verificaron los genes completos de 3 *contigs* de congrosa (MiDN37676\_124 y MiDN37676\_123, MiDN6861) y 4 de ibirapitá (PdDN24034\_011, PdND60561, PdND64469, PdND8737). Los genes obtenidos presentaron estructuras típicas de defensinas de plantas con 2 exones y un intrón de longitud variable que interrumpe la secuencia que codifica el péptido señal (Figura 2.1-11). Para dos *contigs* de ibirapitá, PdND18833 y PdDN14712, se verificó solamente la secuencia que codifica el péptido maduro. A nivel de proteína, todas parecen tener un péptido señal de acuerdo con SignalP y podrían ser solubles y localizadas extracelularmente de acuerdo con DeepLoc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc>).

Las mayoría de las secuencias encontradas en ambos transcriptomas codifican péptidos con similitud con "defensinas verdaderas" que tienen ocho cisteínas en posiciones conservadas y los motivos CS $\alpha\beta$  y  $\gamma$ -core. En función de la distribución de las cisteínas pueden clasificarse en dos grupos definidos por Slavokhotova y colaboradores (2015): DEF35, CX<sub>5-10</sub>CX<sub>4-6</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>9-15</sub>CX<sub>5-12</sub>CXCX<sub>3</sub>C y DEF32, CX<sub>4-25</sub>CX<sub>2-12</sub>CX<sub>3-4</sub>CX<sub>3-17</sub>CX<sub>4-32</sub>CXCX<sub>1-6</sub>C (Tabla 2.1-1 y 2.1-2). Además de las cisteínas y la glicina que forma el motivo  $\gamma$ -core, tienen otros aminoácidos conservados en esta zona: una glicina, un ácido glutámico y una serina. Estos residuos están presentes en la gran mayoría de defensinas con estructura 3D determinada.

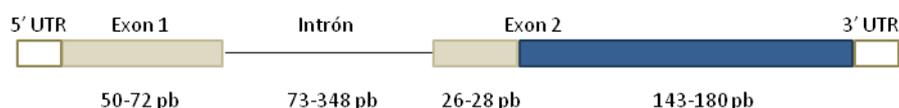


Figura 2.1-11 Esquema de la estructura de genes verificados. Se indica el rango de tamaños de cada zona (pb).  Regiones No traducidas  Péptido señal  Péptido maduro

Dos péptidos de congrosa, MiDN27898 y MiDN56385, presentaron algunas diferencias con los anteriores: 10 cisteínas organizadas en motivos no descritos hasta la fecha  $CX_{10-11}CX_4CX_3CX_5CX_3CX_3CXCX_3CX_3C$  y ausencia de una de las dos glicinas conservadas. La única defensina cristalizada con estas características es PhD1 de *Petunia hybrida* donde se verifica que las 10 cisteínas intervienen en la formación de enlaces SS. En el caso de MiDN56385, el modelo no es confiable debido a la baja homología con el molde, por lo que no es posible realizar un análisis certero de la estructura. El modelo estructural de MiDN27898 indicaría que puede plegarse con características similares a defensinas, con una hélice  $\alpha$  y tres láminas  $\beta$  antiparalelas. El modelo no utiliza como molde el cristal de PhD1, tampoco predice la conectividad de todas las cisteínas. Es importante resaltar la diferencia de ubicación de las cisteínas adicionales en MiDN27898 y MiDN56385 respecto a PhD1: Cys4' y Cys8' y Cys1' y Cys3' respectivamente (Figura 2.1-12). Sería interesante determinar el rol de las cisteínas adicionales, para lo cual es necesario su clonado y el análisis de actividad de los péptidos silvestres en comparación con mutantes carentes de las mismas.

Con las secuencias de los péptidos maduros de todos los *contigs* analizados en este trabajo se construyó un árbol filogenético (MEGA 7, Kumar *et al.*, 2015), en el que se incluyeron dos defensinas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas para el rastreo de los transcriptomas, defensinas con estructuras reportadas en la base de datos PDB (Protein Data Base) y algunas proteínas con función antimicrobiana comprobada (Tabla A.4, Anexo 4,). Se utilizó el método de *Maximum Likelihood* con un test de *bootstrap* de 1000 repeticiones (Figura 2.1-12). En este análisis las defensinas se separaron en dos grandes grupos, se observa cierta tendencia a que las secuencias de una misma familia vegetal se agrupen. No parece haber correlación con la función de actividad o estructura.

El grupo 1 es más numeroso e incluye mayoritariamente defensinas provenientes de las familias Fabaceae, Solanaceae y Poaceae. Mientras que las defensinas de las dos últimas familias están agrupadas por familia, las secuencias de fabáceas están distribuidas en diferentes ramas. Cabe mencionar que los péptidos de solanáceas tienen la particularidad de presentar un extremo C-terminal más largo relacionado con el almacenamiento en vacuolas (defensinas de clase II). La mayoría de las

secuencias verificadas en este trabajo tanto de ibirapitá (Fabaceae) como de congorosa (Celastraceae), PdDN18833, PdDN64469, PdDN8737, PdDN60561, MiDN6861, MiDN37676, están juntas a la defensina de ceibo EcDf1, PDF1.2A\_ARATH de *A.thaliana* (ensamblado del transcriptoma) y DEF4\_MEDTR de *Medicago truncatula* (UniProtKB G7L736; PDB 2LR3), usada como molde para modelar el péptido maduro de MiDN6861 (sección 2.1a). PdDN14712 se ubica en otra rama, junto al resto de las secuencias reportadas de la familia Fabaceae.

En el grupo 2 se ubicaron los *contigs* MiDN33432 (congorosa, no verificado) y PdDN24034 (ibirapitá, verificado) próximos a las defensinas HsAFP1 y DEF1\_AESHI de la familia Brassicaceae. Los *contigs* de congorosa con 10 cisteínas, MiDN27898 y MiDN56385 (no verificados) se agruparon en otra rama junto a PdDN11865 (ibirapitá, no verificado), muy lejos de la proteína PhD1 de *Petunia hybrida* (ubicada en el grupo 1). La defensina de *Pinus sylvestris* PsDEF1 parece ser la más distante dentro del grupo 2.

En resumen, el análisis global muestra las secuencias de ambos transcriptomas distribuidas en diferentes *clusters* del árbol, no limitándose a los *clusters* donde se encuentran las defensinas utilizadas para el rastreo de los transcriptomas. El agrupamiento de las secuencias no se relaciona con la actividad antimicrobiana (Tabla A4, Anexo 4) ni con la cantidad de residuos Cys.

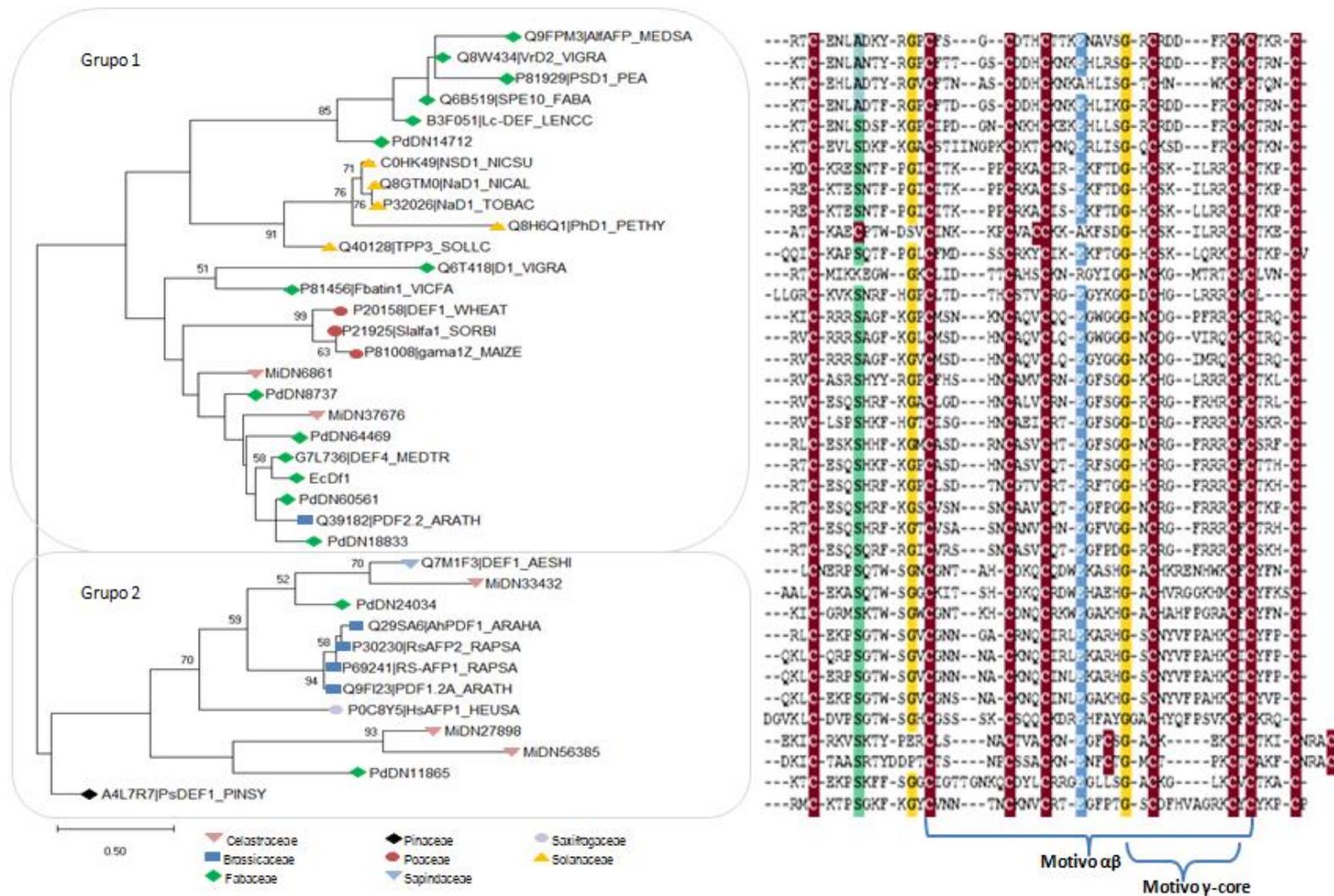


Figura 2.1-12. Izquierda: Arbol filogenético construido con el programa MEGA 7 con las secuencias correspondientes al péptido maduro, test de *Maximum Likelihood*. Se indican únicamente los valores con frecuencias mayores a 50. Derecha: alineamiento de las secuencias. Se indican Cys en rojo y otros residuos conservados: serina (verde), glicina (amarillo), glutamato (azul).

## 2.2. Análisis del péptido MiDf6861 de congorosa

Entre las secuencias transcriptómicas verificadas, MiDN6861 de congorosa se seleccionó para la caracterización de su actividad antimicrobiana por pertenecer a una especie vegetal autóctona, de uso en medicina natural y aún no estudiada. De las dos secuencias de congorosa verificadas, MiDN6861 resulta ser la más interesante debido a que se diferencia en algunos residuos del motivo  $\gamma$ -core (relacionado con la actividad antifúngica, Van der Weerden *et al.*, 2013) respecto a la defensina EcDf1 previamente caracterizada por el grupo.

Como se describe en las secciones siguientes, para la producción heteróloga en *E. coli*, se clonó la secuencia correspondiente al péptido maduro (de aquí en adelante MiDf6) en vectores de expresión pET compatibles con células de *E. coli* DE3. Se comparó expresión en dos vectores, dos hospederos y diferentes condiciones de inducción (temperaturas, medio de cultivo, tiempo).

Las cepas hospederas analizadas fueron *E. coli pLYsS Rosseta Gami* (Novagen) y *Shuffle* (New England Biolabs), seleccionadas porque facilitan la formación de puentes disulfuro, requisito para la producción de defensinas. *Rosseta Gami* además posee tRNAs para los codones eucariotas correspondientes a los aminoácidos arginina, leucina, glicina y prolina que están presentes en la secuencia de MiDf6.

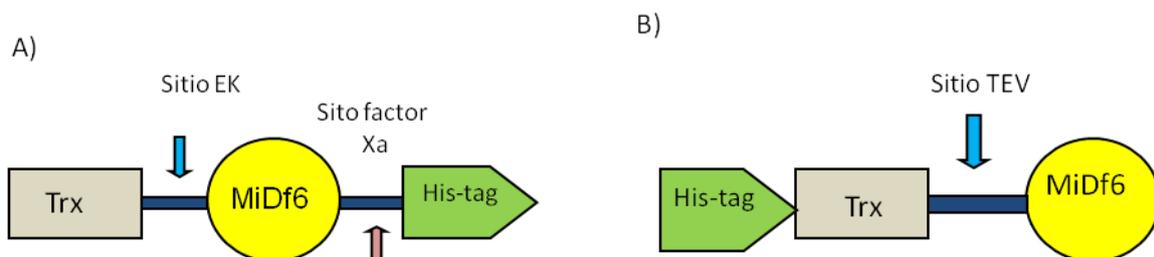


Figura 2.2-1. Esquema de construcción en vectores de expresión. a) pET102D. b) pET32c.

Los vectores de expresión pET102D (Invitrogen) y pET32c (cedido por el Laboratorio de Investigación en Leucemia Linfóide Crónica, Instituto Pasteur Montevideo) tienen el promotor T7 inducible por lactosa, origen de replicación pMB1-*rop* (bajo número de copias) y son ampliamente utilizados para la producción de proteínas recombinantes. El vector pET102D se utilizó previamente en nuestro equipo para la expresión de una esnaquina de ibirapitá y una defensina de ceibo (Rodríguez Decuadro *et al.*, 2018 y Rodríguez Decuadro, 2018). Cuenta con una secuencia que codifica tiorredoxina, y otra que codifica un motivo de 6 histidinas (HisTag), entre las que se clona la secuencia de interés. La construcción en este vector produce la proteína recombinante Trx-MiDf6-HisTag (MiDf6p102), por lo que la obtención del péptido MiDf6 requiere dos cortes para separar la tiorredoxina y la etiqueta de histidinas (Figura 2.2-1a). El vector pET32c también tiene las secuencias codificantes de tiorredoxina e HisTag pero el orden de la construcción es diferente: *histag::trx::midf6* (MiDf6p32), la defensina se obtiene a partir de un único corte (Figura 2.2-1b).

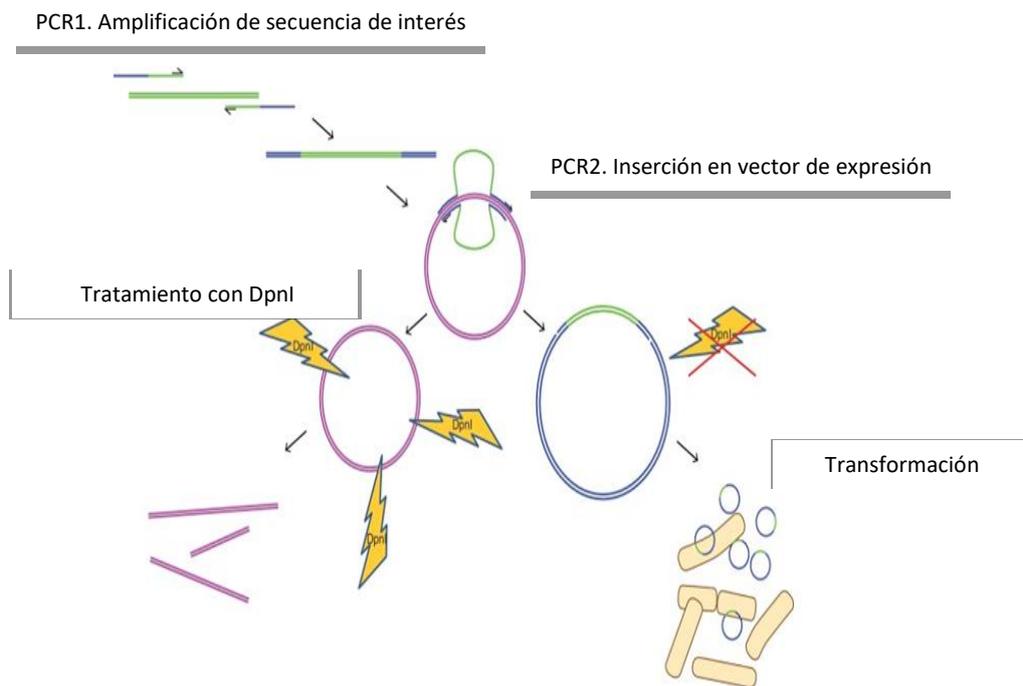
Las proteínas recombinantes MiDf6p32 y MiDf6p102, fueron purificadas por afinidad usando la etiqueta HisTag para evaluar su actividad contra varios microorganismos blanco. Los valores teóricos de peso molecular y punto isoeléctrico (PI) de los péptidos obtenidos durante este trabajo, se calcularon con el programa Protparam (<http://web.expasy.org/protparam>, Tabla 2.2-1).

**Tabla 2.2-1.** Valores de peso molecular y punto isoeléctrico de las moléculas recombinantes analizadas en este trabajo (Prot param).

Proteína	Nombre	PM (kDa)	PI
Trx-Midf6-HisTag	MiDf6p102	19.6	7.6
Midf6-HisTag	MiDf6Histag	6.9	9.5
Trx-40aa-HisTag	Trx*	17.3	5.6
40aa-HisTag	*HisTag	4.5	6.6
HisTag-Trx-Midf6	MiDf6p32	19.5	8.1
Midf6	MiDf6	5.4	9.5

### 2.2.1. Subclonado de *midf6* en vectores de expresión

La secuencia de ADN de MiDf6 (péptido maduro) se subclonó a partir del plásmido pGMiDf6861 (Tabla M-2, Materiales y métodos) mediante *Restriction Free cloning* (RF cloning, van den Ent y Löwe, 2006) y *Transfer PCR* (TPCR, Erijman *et al.*, 2011) en los vectores pET102D y pET32c respectivamente (Figura 2.2-2). Para cada construcción el *primer Forward (F)* (MiDf6/102\_F o MiDf6/32\_F) está formado por 22 bases, ubicadas en el extremo 5', que hibridan con el vector pET102D ó pET32c, seguidas por 17 bases complementarias al extremo 5' del gen de interés. El *primer Reverse (R)* (MiDf6/102\_R ó MiDf6/32\_R) hibrida en 5' con 32 y 14 bases del vector pET102D y pET32c respectivamente, seguido de 22 bases del extremo 3' del gen de interés. En el caso del *primer reverse* de clonado en pET32c se agrega un codón de terminación (Tabla M-3, Materiales y métodos).



**Figura 2.2-2. Esquema de metodologías de clonado.** *RF-cloning* las reacciones PCR1 y PCR2 se realizan por separado. En *T-PCR* ambas reacciones de PCR se realizan conjuntamente en un único tubo (Bond *et al.*, 2012)

### 2.2.1.a. Subclonado en vector pET102D

En una primer PCR se amplificó la secuencia *midf6* a partir del plásmido pGMiDf6861 usando dos temperaturas de *annealing* con los *primers* MiDf6/102 R y F (Tabla M-3, Materiales y métodos). El producto de tamaño esperado de 196pb (Figura 2.2-3) correspondiente al inserto más la secuencias complementarias al vector, se purificó y se usó como único *primer* (“*megaprimer*”) en una segunda amplificación que tuvo como molde el vector de expresión. En esta segunda reacción de PCR se incluyó un control sin “*megaprimer*”. Los plásmidos parentales se eliminaron en base a su metilación, utilizando la enzima DpnI y el producto final se utilizó para transformar células *E. coli* *Top10*. Las células transformadas se seleccionaron por resistencia a ampicilina. En el control sin “*megaprimer*” no se desarrollaron colonias, indicando la digestión de los plásmidos parentales.

A partir de seis clones desarrollados, se verificó la presencia del inserto por amplificación con *primers* complementarios al vector (P102amp\_R y F, Tabla M-3, Materiales y métodos) que permiten distinguir por tamaño la presencia (339 pb) y ausencia (288 pb) del inserto *midf6*. Se secuenciaron dos clones positivos con el *primer* universal *T7 terminator* y se verificó que en el clon pET102MiDf6\_c1 la secuencia clonada no tenía errores y el marco de lectura era correcto, por lo que se seleccionó para continuar con el trabajo. También se verificó la secuencia del plásmido p102D sin defensina (Trx\*), usado como molde en estas PCR, como control de expresión (Secciones 2.2.2-2.2.4) y en ensayos de actividad (Sección 2.3).

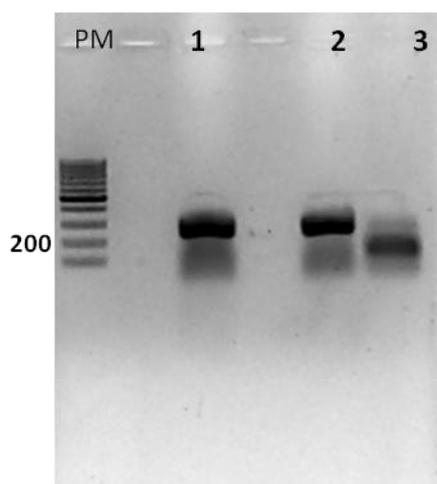
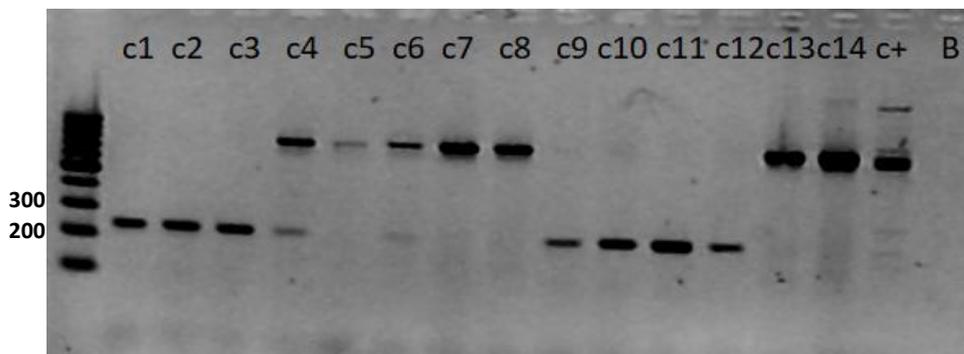


Figura 3.3 Primera reacción de amplificación de RF-cloning. 1: T. annealling 56°C. 2.: T. annealling 58°C 3. Blanco. PM. Marcador de peso molecular 100pb (ThermoFisher®)

### 2.2.1.b. Subclonado en vector pET32c

En este caso el gen *midf6* se amplificó con los *primers* específicos MiDf6/32 R y F (Tabla M-3, Materiales y métodos) a partir del plásmido pGMiDf6861 (Tabla M-2, Materiales y métodos) y se insertó en un vector pET32c por sustitución del gen *gfp* en el plásmido p32GFP (Tabla M-2; Correa *et al.*, 2014). En una primera instancia el clonado se realizó por el método de *RF-cloning*. Los clones se recuperaron por transformación de *E.coli DH5α* en lugar de *Top10* ya que estas últimas no tuvieron buen crecimiento cuando se las transformó con este vector. En el análisis del inserto de los clones con *primers* complementarios al vector (pET32amp\_1F y R, Tabla M-3, Materiales y métodos) no se obtuvo el tamaño de amplicón esperado (235 pb), sino el correspondiente al vector con *gfp* (811 pb). Luego de varios intentos se cambió la estrategia por *Transfer PCR* (TPCR, Erijman *et al.*, 2011). Este sistema permite dos amplificaciones sucesivas sin necesidad de purificar el “*megaprimer* “: la amplificación del gen de interés a partir del plásmido donador y la integración en el vector de expresión. Las etapas siguientes, digestión de ADN metilado por DpnI y recuperación de clones por transformación de *E. coli*, son idénticas a *RF-cloning*.



**Figura 2.2-4 Verificación de inserto en pET32.** Electroforesis en gel agarosa de amplicones obtenidos a partir de 14 clones construidos por T-PCR. C+: control de amplificación a partir p32gfp. B: blanco sin ADN. Marcador de peso molecular 100pb (ThermoFisher®). Tamaño esperado 235pb.

De 13 clones analizados, 7 mostraron amplicones del tamaño esperado para el inserto *midf6* y fueron secuenciados para verificar el correcto marco de lectura (*primer* pET32\_seqF1, Tabla M-3, Materiales y métodos). Los restantes clones tuvieron el tamaño esperado para *gfp* (Figura 2.2-4), si bien en el control sin *primers* no se observaron colonias, lo que indicaba degradación de los vectores parentales. Se seleccionó el clon DH5 $\alpha$ p32MiDf6c9 que contiene el vector de expresión p32MiDf6 (Tabla M-2, Materiales y métodos).

### 2.2.2. Evaluación de las condiciones de expresión

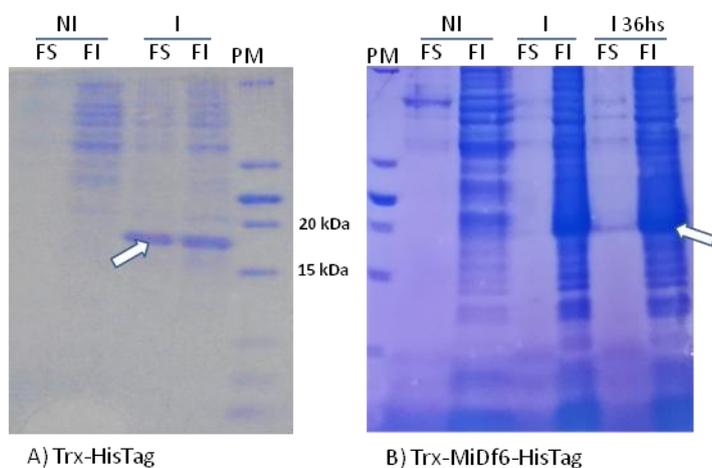
Para evaluar las condiciones de expresión, con los vectores construidos p102MiDf6, p32MiDf6 y p102Trx\* (sin defensina) se transformaron células *E.coli Rosseta Gami (RG)* y *Shuffle* obteniéndose las cepas Rgp102MiDf6c1, Shp102MiDf6c1, Rgp32MiDf6c2, Shp32MiDf6c2, Rgp102Trxc2, Shp102Trxc1 (Tabla M-1, Materiales y métodos). Con estas cepas se realizaron experimentos piloto (cultivos de 5 mL) variando el medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación para encontrar las condiciones donde se observe la mayor producción de proteínas en fase soluble. En cada ensayo piloto se incluyó la cepa reportera Rgp32GFPC1 (Tabla M-1, Materiales y métodos) obtenida previamente (Sección 2.2.1b) que permitió visualizar por fluorescencia a 395nm, la inducción en las condiciones del ensayo (Figura 2.2-5).

Los tiempos analizados fueron intervalos de 6hs hasta 36hs y las temperaturas 20°C, 28°C, 37°C. Los medios de cultivo fueron LB y “autoinductor” ZYM5052 (Studier, 2005), ambos suplementados con ampicilina. En el primer caso la inducción se realizó por agregado de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) cuando la DO<sub>600</sub> del cultivo se encuentra entre 0.5 y 0.7. En el segundo caso no es necesario agregar un inductor externo ya que el medio tiene glucosa y lactosa. La primera se encuentra en menor concentración y es consumida totalmente en las primeras etapas de incubación (DO<sub>600</sub>=1), a partir de ese momento, en ausencia de represor, la lactosa induce la expresión de la proteína recombinante. Tanto en LB como en ZYM5052, la etapa pre inducción se realizó a 37°C y luego el cultivo se incubó a la temperatura de producción que se quería evaluar (Materiales y métodos). La producción se visualizó mediante SDS-PAGE.



**Figura 2.2-5. Visualización de inducción en cultivo líquido.** Cepa reportera *Rgp32GFPC1* irradiada con luz a 395nm. Izquierda cultivo inducido, derecha no inducido

Tanto para las construcciones con *midf6* (MiD6p102 y MiDf6p32) como para la construcción sin AMP (Trx\*), únicamente se obtuvo inducción en células *RG* en medio LB a las 24 y 36 hs, temperatura de inducción 28°C. La expresión de Trx\* se observó mayoritariamente en la fase soluble (Figura 2.2-6a), mientras que la de MiDf6p102 y MiDf6p32 en la fase insoluble (Figura 2.2-6b). En las cepas transformadas con el vector pET32c para obtener expresión fue necesario aumentar la concentración de ampicilina al doble durante la fase de producción (inducida).



**Figura 2.2-6. Producción de proteínas recombinantes en células *E.coli* RG transformadas con vectores derivados de pET102D.** Electroforesis SDS-PAGE tris-tricina. Cultivos en LB ampicilina. Inducción con IPTG a 28°C 24 horas, salvo cuando se indica 36 horas. A) Control Trx-HisTag (17.3 KDa). B) Trx-MiDf6-HisTag (19.6 kDa). FS: fase soluble; FI: fase insoluble. NI :cultivo no inducido; I: cultivo inducido. Flechas: proteínas recombinantes. PM: Marcador de peso molecular de 100 KDa (ThermoFisher®).

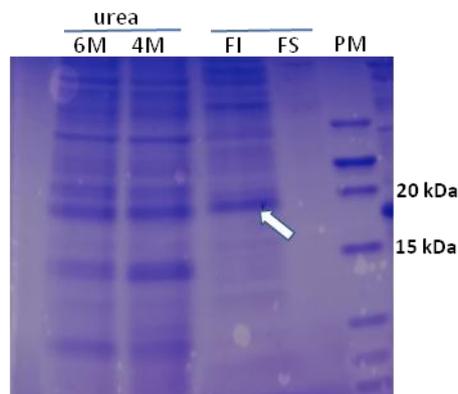
Para aumentar la relación entre fase soluble e insoluble de las proteínas MiDf6p102 y MiDf6p32 se utilizaron dos estrategias: i) debido a que en el centrifugado luego de la lisis celular pudo haberse “arrastrado” proteína soluble en el *pellet*, se agregaron dos lavados sucesivos de la fase insoluble; ii) se cambió de método de lisis por sonicado por el método de digestión con tritón (Materiales y métodos). En ambos casos el aumento de la cantidad de proteína en la fase soluble no fue significativo, se continuó trabajando con el método de lisis por sonicado.

En resumen, a partir de estos resultados se seleccionaron para continuar con el trabajo de producción a mayor escala (100 ml) las cepas Rgp32MiDf6c2, Rgp102MiDf6c1 y Rgp102Trxc2; condiciones de expresión: 28°C durante 24hs en medio LB ampicilina inducido por IPTG, lisado de células por sonicado.

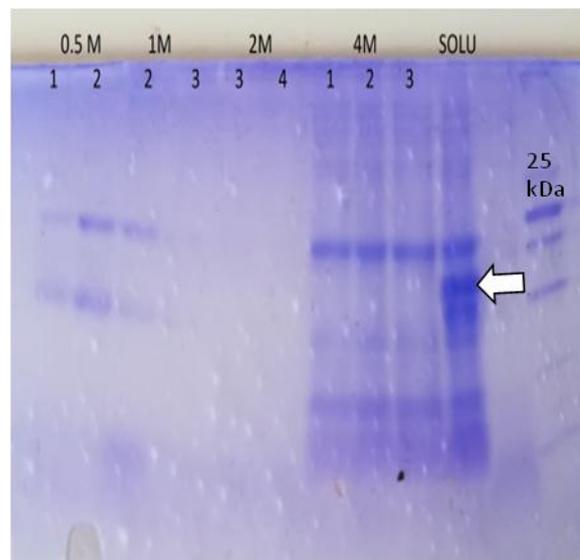
### 2.2.3. Solubilización de las proteínas recombinantes.

A partir de cultivos de 100ml de ambas construcciones (MiDf6p32 y MiDf6p102) en condiciones de producción antes mencionadas, la fracción insoluble de cada uno se separó en dos partes y se trataron con soluciones de concentraciones 6M y 4M de urea para solubilizarlas. Los resultados de este ensayo se evaluaron mediante SDS-PAGE. En ambos casos (no mostrado para la construcción en pET102D), luego del tratamiento, las proteínas se visualizaron en la fracción soluble (Figura 2.2-7). No se observaron diferencias significativas entre la cantidad de proteína solubilizada en función de la concentración de urea, por lo cual los tratamientos siguientes se hicieron con la solución de menor concentración (4M).

**Figura 2.2-7. Solubilización de proteína MiDf6p32 con urea.** Electroforesis SDS-PAGE tris-tricina. FI y FS: fase soluble y fase insoluble antes de solubilización. Flecha: proteína solubilizada (19.6kDa). PM: marcador de peso molecular de 100 KDa (ThermoFisher).



Generalmente en los agregados insolubles se forman interacciones hidrofóbicas inespecíficas que llevan al plegamiento incorrecto de las proteínas y la solubilización rompe estas interacciones pero no garantiza que las proteínas adopten su conformación nativa. Para favorecer el replegado de las proteínas MiDf6p32 y MiDf6p102 solubilizadas, una vez unidas a la columna IMAC, se lavó con un gradiente decreciente de urea de manera de eliminarla suavemente (Materiales y métodos). Las fracciones eluidas durante todo el proceso se visualizaron mediante SDS-PAGE para verificar posibles pérdidas de las proteínas de interés. No se observaron bandas con el peso correspondiente a las proteínas de fusión MiDf6p32 (19.6 kDa) y MiDf6p102 (19.5 kDa) en ninguna fracción (Figura 2.2-8), lo que indica que las proteínas recombinantes unidas a la columna por la interacción del motivo de seis histidinas (HisTag) con el Ni<sup>2+</sup>, quedaron retenidas. Las bandas observadas corresponden a proteínas que no tienen este u otros motivos de unión a la columna.

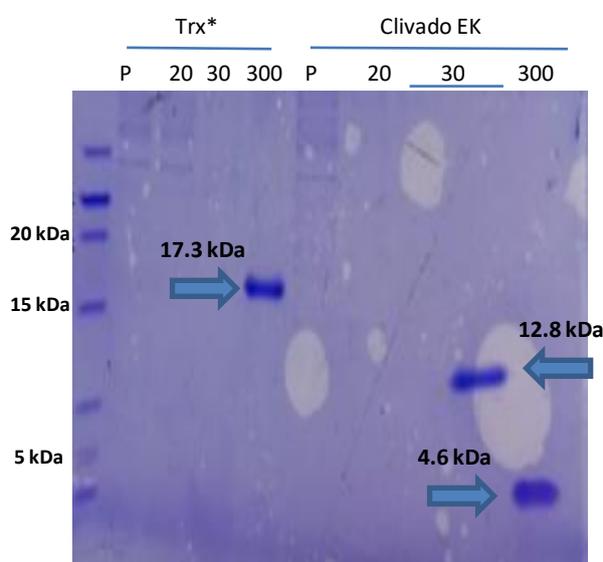


**Figura 2.2-8 . Refolding con gradiente de urea de la proteína en construcción pET102D.** Electroforesis SDS-PAGE tris-tricina: 0.5M, 1M, 2M, 4M: concentraciones de urea; números: fracciones colectadas). Solu: proteína solubilizada en 4M urea antes de entrar a la columna. Flecha ; proteína recombinante (19.56kDa). Marcador de peso molecular de 100 KDa (ThermoFisher).

## 2.2.4. Clivado y purificación de MiDf6-HisTag

Para eliminar la tiorredoxina unida al péptido de interés se debe realizar un clivado con una proteasa sitio específica. La construcción en pET102 (Trx-MiDf6-HisTag) tiene un sitio de reconocimiento de enterokinasa (EK) y como el motivo HisTag se encuentra unido al péptido, luego del corte con la enzima, éste continúa unido a la columna. La digestión puede realizarse en *batch* luego de la purificación de la proteína, lo que requiere etapas previas de elución, diálisis, liofilización, resuspensión, y una nueva purificación posterior al clivado donde se repiten las mismas etapas. Para reducir las pérdidas asociadas a cada ciclo de purificación, la proteína de fusión MiDf6p102 fue clivada en columna luego del replegado, eliminando así la purificación previa.

Con el objetivo de estimar el tiempo de incubación en columna requeridos para el corte completo, se hicieron ensayos de clivaje de Trx\* (Trx-40aa-HisTag), cuyo orden de construcción es similar al de MiDf6p102, durante 48 y 60 hs. Se requirió 60 hs para alcanzar digestión total. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se utilizó un gradiente de concentraciones de imidazol entre 20 y 500 mM y los eluidos se visualizaron en SDS-PAGE.



**Figura 2.2-9 Evaluación de clivado en columna de Trx\*.** Electroforesis SDS-PAGE tris-tricina. Izquierda: purificación de proteína Trx\* sin digerir. Derecha: purificación luego de tratamiento con EK. Perc, percolado; 20, 30, 300, concentraciones de imidazol (mM). PM, Marcador de peso molecular de 100 KDa (ThermoFisher). Bandas esperadas: Trx-41aa-HisTag (17.3 kDa), Trx (12.8 kDa) y 41aa-HisTag (4.6 kDa).

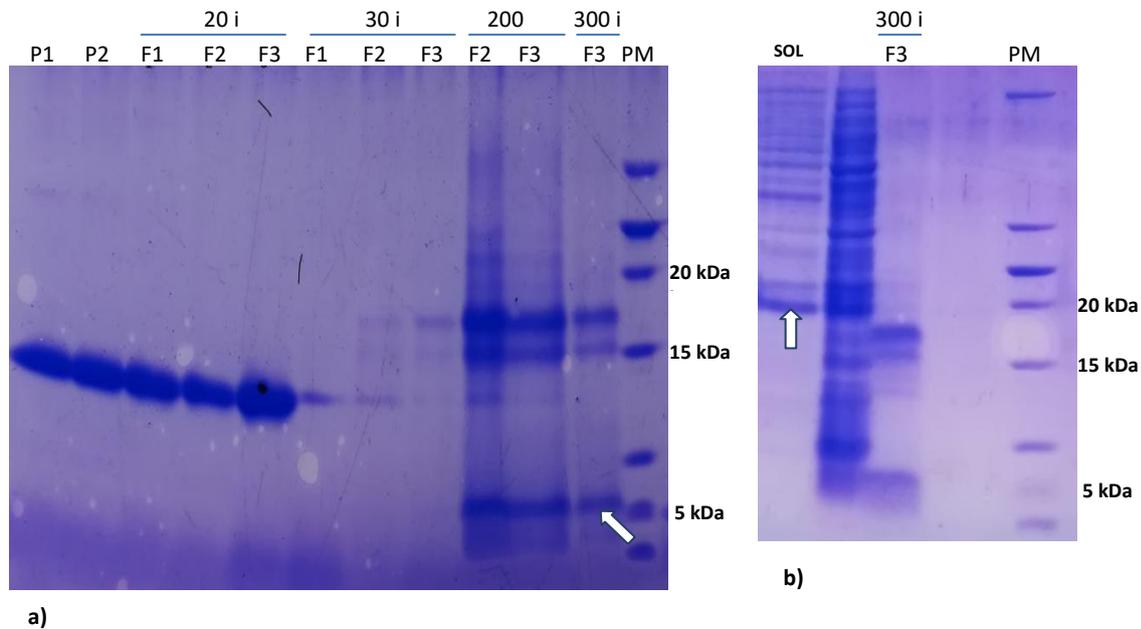
En paralelo se purificó una alícuota de la proteína sin digerir. En los tres ensayos, las proteínas con motivo HisTag, Trx\* e HisTag\* (40aa-HisTag), se obtuvieron en los eluidos con 300mM de imidazol y aquellas sin HisTag en los eluidos con 20 y 30 mM (Figura 2.2-9). En las fracciones con concentraciones de imidazol intermedias (50-200 mM) y mayores a 300 mM (400 y 500mM) no se observaron bandas.

Estas muestras tienen el comportamiento típico en la purificación IMAC-Ni<sup>2+</sup>, en la cual las proteínas se separan por elución con concentraciones crecientes de imidazol que compite por los sitios de unión a Ni<sup>2+</sup>. A bajas concentraciones de imidazol, comúnmente 30-50 mM, se eliminan las proteínas no unidas a la columna y las unidas por interacciones inespecíficas menos fuertes (Trx). Las proteínas con HisTag, unidas fuertemente, se liberan cuando las concentraciones del competidor son elevadas (Trx\* y HisTag\*).

Las mismas condiciones de clivado (relación molar péptido/enzima, tiempo y temperatura) se utilizaron para el tratamiento de MiDf6p102. Las fracciones colectadas luego de la digestión se visualizaron en SDS-PAGE donde se observaron bandas correspondientes a la tiorredoxina en percolados y fracciones con bajas concentraciones de imidazol (Figura 2.2-10a). Como esperado, a altas concentraciones de competidor (200 y 300 mM) se observó una banda con el tamaño de MiDf6-HisTag (6.7kDa). Varias bandas adicionales se observaron en las fracciones de 200 mM, dos de las cuales (entre 20 y 15 kDa) persisten en 300 mM. Estas últimas no migran igual a la proteína MiDf6p102 sin digerir (Figura 2.2.10b).

La separación de proteínas no fue tan eficiente como en el experimento anterior. La elución de MiDf6-HisTag comienza a concentraciones de imidazol, donde aún continúa habiendo algo de proteína que migra como la Trx libre. Una explicación podría ser que se haya subestimado la cantidad de péptido y que los volúmenes de elución de baja concentración de imidazol fueran insuficientes para elución total de proteínas sin etiqueta. Sin embargo, en las últimas fracciones (F5-7) de elución con 30 mM, esta banda no era visible en gel ni se detectaron proteínas por Bradford. Por otra parte, en el ensayo con Trx\* no se detectaron proteínas entre 15 y 20 kDa como en éste. En ambos experimentos se utilizaron las mismas condiciones de cultivo y tratamientos posteriores, el mismo hospedero *E. coli* RG, y las proteínas se expresaron en el mismo

vector. La única diferencia es el péptido expresado (Trx-40aa-HisTag y Trx-MiDf6-HisTag). Podría suponerse que la naturaleza de MiDf6 de alguna forma afecta la unión de las histidinas a la columna.



**Figura 2.2-10 Clivado de Trx-MiDf6-HisTag.** Electroforesis SDS-PAGE tris-tricina. **a)** Purificación luego de tratamiento con EK durante 60 hs. P1 y P2: percolados; F1-3: Fracciones eluidas; 20i, 30i, 200i, 300i: concentraciones de imidazol (mM). La flecha indica banda de tamaño esperado para MiDf6-HisTag (6.7 kDa). **b)** Comparación de bandas obtenidas antes y después del clivado. SOL: proteína solubilizada en 4M urea antes de entrar a la columna. La flecha indica banda de tamaño esperado para Trx-MiDf6-HisTag (19.6 kDa). PM: Marcador de peso molecular 100 KDa (ThermoFisher®).

La muestra, compuesta por las fracciones obtenidas con 300 mM de competidor, se dializó, liofilizó y se resuspendió en buffer fosfato. El mapeo peptídico (MS-MS, Unidad de Bioquímica Proteómica y Análisis, Instituto Pasteur, Montevideo) de la muestra purificada, confirmó la presencia del péptido MiDf6 (Figura 2.2-11). También muestra presencia de tiorredoxina, lo que indica que el clivado y/o las condiciones de purificación no fueron suficientes para eliminarla totalmente, si bien a juzgar por lo obtenido en SDS-PAGE (Figura 2.2-10) la cantidad de la misma es baja.

```

1  MGSDKIIHLT DSEFDIVLK ADGAILVDFW AHWCGPCKMI APILDEIRDE
51  YQGKLTVAKL NIDHNPGRAP KYGIRGIPTL LLEKNGEVAA TKVGALSKGQ
101 LKEFLDANLA GSGSGDDDDK SRVCASRSHY YRGPCFHSNH CRMVCRNEGF
151 SGGKCHGLRR RCFCTKLCIE GRHHHHHH

```

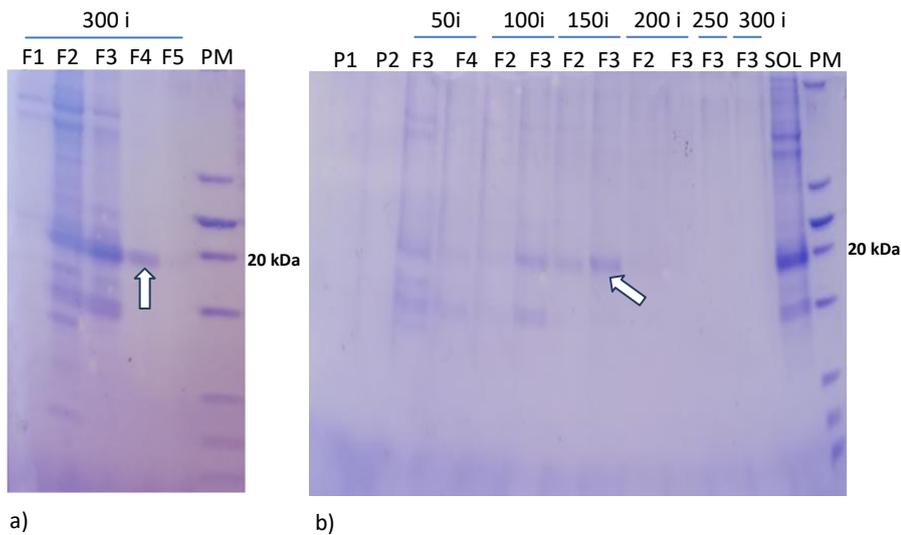
Figura 2.2.11 Mapeo peptídico MS-MS. Muestra MiDf6:HisTag. En rojo, residuos mapeados

El hecho de que en el mapeo peptídico no se identifiquen otras secuencias en la muestra, sugiere la posibilidad de que las bandas de peso molecular entre 15 y 20 kDa correspondan a otras proteínas. La presencia de estas bandas podría explicarse por posibles interacciones péptido-péptido, tiorredoxina-péptido del tipo covalente. Podría suponerse que debido a la naturaleza catiónica de estos péptidos, el SDS no es suficiente para enmascarar todas las cargas positivas dentro del péptido (Herbel *et al.*, 2015) y las interacciones electrostáticas permiten la formación de dímeros, oligómeros o estructuras complejas (Song *et al.*, 2011; Ermakova *et al.*, 2016).

Patrones de bandas similares fueron observados tanto con EcDf1 (defensina de ceibo) como con la esnaquina PdSN1 previamente estudiadas por nuestro grupo como en bibliografía (Rodríguez Decuadro *et al.*, 2018, Rodríguez Decuadro *et al.*, manuscrito en preparación). Se podría pensar también que este comportamiento es característico de este tipo de moléculas, quizás la cantidad de  $\beta$ -mercaptoetanol (agente reductor utilizado en la electroforesis) no sea suficiente para reducir los 8 residuos Cys, por lo que algunos puentes disulfuro podrían permanecer oxidados. Podrían estar formándose entre péptidos, peor además como la tiorredoxina también presenta este tipo de enlaces también podrían formarse complejos tiorredoxina-péptido degradado o viceversa.

### 2.2.5. Purificación de MiDf6p32

La proteína MiDf6p32 se purificó luego del replegado en columna (Sección 2.2.3). En una primera instancia se utilizó imidazol a 20, 30 y 300 mM. La proteína se obtuvo en los eluídos con 300 mM, sin embargo únicamente se encuentra “limpia” a partir de la fracción 4; en las fracciones anteriores se observaron además varias bandas de diferentes tamaños (Figura 2.2-12a).



**Figura 2.2-12 Purificación de MiDf6p32.** Electroforesis SDS-PAGE tris-tricina. a) Primera purificación. b) Segunda purificación. 50i, 100i, 150i, 200i, 250i, 300i concentraciones de imidazol (mM). F1-5: fracciones de cada eluido. P1 y P2: percolados. SOL: proteína solubilizada en 4M urea. PM: Marcador de peso molecular 100 kDa (ThermoFisher). Las flechas indican bandas del tamaño esperado para la proteína recombinante.

Las fracciones 1-3 se purificaron nuevamente luego de ser dializadas. Para tener una mejor separación de las proteínas, se utilizó mayor rango de concentraciones de imidazol disminuyendo el incremento entre dos lavados sucesivos (50, 100, 150, 200, 250 y 300).

La proteína de interés se obtuvo sin impurezas visibles con 150mM de imidazol. A concentraciones menores se eluyó junto a impurezas (Figura 2.2-12b). Las fracciones que contenían la proteína de interés (F4-5 con 300 mM primer fraccionamiento y F2-7 con 150 mM segundo fraccionamiento) se juntaron, dializaron, liofilizaron y resuspendieron en buffer fosfato para posteriores ensayos de actividad (Sección 2.3).

Llama la atención la cantidad de proteínas retenidas en la columna durante el primer fraccionamiento, y que eluyen a alta concentración de imidazol junto a la proteína con el motivo HisTag. *A priori* no pueden explicarse por errores puntuales en la manipulación, como mal empaquetamiento de la columna o estado de las soluciones empleadas, ya que estas variables habrían producido elución en todas las concentraciones. En el segundo fraccionamiento, las impurezas se eliminaron mayoritariamente con el pasaje de la primera solución (50 mM de competidor), pero no totalmente, ya que algunas bandas se obtuvieron con 100 mM. Esta concentración, si es bien menor que en el primer fraccionamiento, sigue siendo elevada en relación a otros ensayos en los que 30-50 mM

es suficiente. Por otra parte, en este ensayo, la proteína con motivo HisTag sale de la columna con solamente 150 mM de competidor. Este hecho podría indicar que el imidazol no fue completamente eliminado durante la diálisis, aumentando la concentración real de competidor en columna. De alguna forma, esta explicación se contrapone a que sea necesaria una alta concentración (100 mM) para eluir impurezas.

No puede descartarse que parte de estos resultados estén vinculados a las propiedades de la proteína recombinante como se mencionó antes (Sección 2.3.5). Está claro que el protocolo de purificación depende de cada proteína y debe ser estandarizado en cada caso. En este trabajo se utilizaron dos construcciones diferentes. MiDf6p102 tiene la etiqueta de histidina en el extremo C-terminal del péptido MiDf6 (Trx-MiDdf6-HisTag), mientras que en MiDf6p32 se encuentra en el extremo N-terminal de la tiorredoxina (HisTag-Trx-MiDf6). Quizás esto esté relacionado con la exposición del motivo HisTag y por lo tanto con la afinidad de unión a la columna.

Como conclusión la purificación de esta proteína requiere usar más etapas de purificación con concentraciones crecientes de imidazol para eliminar impurezas (hasta 100 – 150 mM) antes de eluir la proteína de interés.

### **2.2.6. Cuantificación de péptidos purificados**

Las proteínas MiDf6-Histag (construcción en p102 clivada) y HisTag-Trx-MiDf6 (construcción en pET32 sin clivar) se cuantificaron por el método de Bradford. En el caso de MiDf6-Histag el método no permitió cuantificar directamente al péptido clivado, por lo que la concentración se determinó a partir de la cuantificación de MiDf6p102 (antes de separar la Trx) en función de la relación estequiométrica 1:1 asumiendo un 100% de eficiencia en el clivado. Las concentraciones obtenidas fueron 11.2 y 1.4  $\mu\text{M}$  para MiDf6-Histag y HisTag-Trx-MiDf6 respectivamente. La masa de células obtenidas por cada 100 ml de cultivo fue 0.5g independientemente del vector. El rendimiento entonces fue de 88 y 11  $\mu\text{g/g}$  de células para MiDf6-HisTag y HisTag-Trx-MiDf6 respectivamente.

## 2.3 Ensayos de actividad antimicrobiana

---

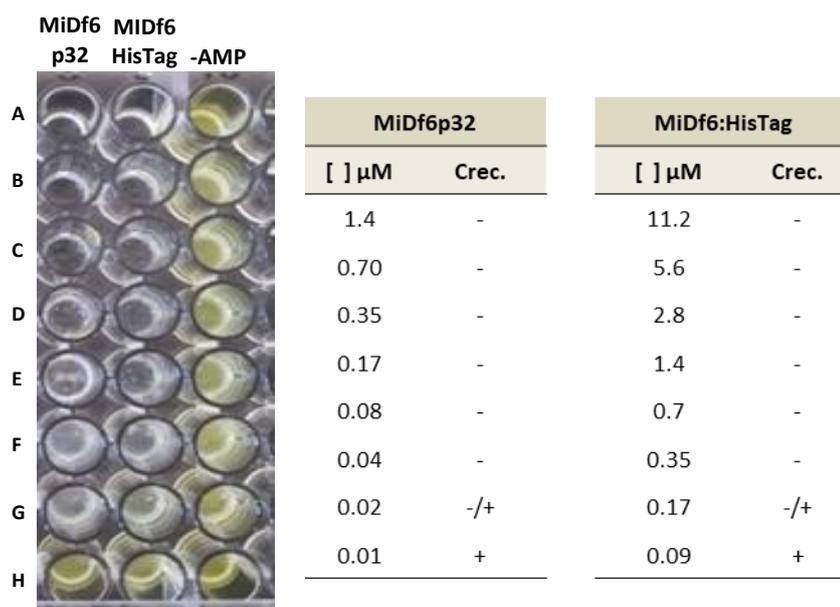
### 2.3.1 Actividad antifúngica del péptido MiDf6

Las proteínas de fusión MiDf6p32 (*histag:trx:midf6*) y MiDf6-HisTag, purificados en la sección anterior, se enfrentaron a *Aspergillus niger*, para evaluar su actividad antimicrobiana. *A. niger*, es patógeno de cebolla (Hayden *et al.*, 1992) y responsable de infecciones pulmonares en pacientes inmuno comprometidos (Schuster *et al.*, 2002). Muchas defensinas inhiben el crecimiento de hongos y este microorganismo en particular es inhibido por la defensina de ceibo (EcDf1) y la esnaquina de Ibirapitá (PdSN1), AMPs analizados en trabajos previos.

El análisis se realizó por determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en medio líquido. Este ensayo consiste en enfrentar el microorganismo blanco a diluciones seriadas de las proteínas purificadas y permite además de verificar la actividad, determinar la mínima concentración donde no se observa inhibición del crecimiento luego de la incubación. En cada ensayo se incluyó un control sin proteína (Trx\*, Materiales y métodos).

Luego de 5 días de incubación, se observó inhibición del crecimiento en casi todas las diluciones tanto para la proteína de fusión MiDf6p32 como para MiDf6-HisTag (Figura 2.3-1). Los valores de CIM obtenidos fueron 0.04 y 0.35  $\mu\text{M}$  respectivamente, es decir que la proteína de fusión con MiDf6 en el extremo C-terminal tuvo 10 veces más actividad que el péptido MiDf-HisTag. Esto puede deberse a que la primera línea de acción de los AMPs generalmente es por interacción electrostática con las membranas y paredes celulares (ver Introducción). Quizás en la construcción MiDf6p32 el péptido tiene menos impedimentos estéricos o las cargas están más expuestas y por lo tanto esta interacción péptido-pared celular se produce más fácilmente. Este hecho (péptido más expuesto) también podría estar relacionado con que la producción de esta proteína fue más laboriosa (se debió agregar mayores presión selectiva para mantener el plásmido) y los rendimientos fueron menores (88 $\mu\text{g/g}$  para MiDf6p102 y 11  $\mu\text{g/g}$  para MiDf6p32).

Estos bajos rendimientos no permitieron realizar el clivado de MiDf6p32 para analizar la influencia de la de la cola de histidina en la actividad, existen estudios que indican que esta etiqueta afecta a la misma (Kant y colaboradores 2009). Así mismo, sería interesante determinar si el clivaje disminuye de manera considerable el valor de MIC de MiDf6p32 para que amerite realizarlo cuando solamente se esté buscando moléculas con actividad elevada, ya que aumenta costos y complejidad.



**Figura 2.3-1 Ensayo de MIC contra *A.niger*.** MiDf6p32 proteína de fusión HisTag-Trx-MiDf6 (pET32). MIDf6:HisTag péptido clivado de construcción *trx::midf6::histag* (pET102). -AMP control sin péptido. Crec: suspensión de esporas sin proteínas Los símbolos +, - y -/+ corresponden a crecimiento igual al control, no crecimiento y menor crecimiento que el control.

### 2.3.2 Ensayos preliminares de *screening* por actividad

La caracterización biológica de los péptidos antimicrobianos requiere una etapa de producción por expresión heteróloga y posterior purificación que es costosa y debe ser optimizada péptido a péptido. Dado que a partir de las secuencias obtenidas en los transcriptomas de ibirapitá y congrosa contamos con varios AMPs verificados y clonados es importante seleccionar las secuencias a analizar. Como el objetivo es encontrar AMPs novedosos, un criterio podría ser elegir los más diversos a nivel de secuencia pero esto no se relaciona con su acción biológica que solo se conoce al final del proceso. La actividad, entonces, es el mejor criterio porque permite seleccionarlos en base al microorganismo que inhiba, o al efecto cida/stasis sobre los microorganismos blanco, etc. Por esta razón sería deseable contar con un método para determinar la

actividad antimicrobiana antes de realizar todo el proceso de producción-purificación y que permita analizar un mayor número de péptidos en menor tiempo.

Con este fin se ensayaron métodos de visualización de actividad, para determinar si pueden ser utilizados en trabajos futuros como método de *screening*, directamente con células de los microorganismos productores de péptidos (cepas productoras) o antes de realizar la purificación. En este caso bacterias transformadas con plásmidos que expresan un AMP (péptido maduro).

Uno de los ensayos fue el de “doble capa” en medio sólido que permite ver halos de inhibición de crecimiento de microorganismos (microorganismo blanco) enfrentados a bacterias productoras (Zhu *et al.*, 2014). El segundo ensayo se realizó en medio líquido (placa de 96 pocillos) donde los microorganismos fueron enfrentados a las bacterias productoras enteras y sonicadas. Los microorganismos blanco analizados fueron *A. niger*; *Candida albicans*, causante de infecciones en pacientes inmuno comprometidos (Person *et al.*, 2010); *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis (Cmm)*, causante del cancro en tomate (Gartemann *et al.*, 2003); *Staphylococcus aureus*, causante de infecciones importantes en humanos (Archer, 1998); *Botrytis cinerea*, patógeno de muchas especies vegetales y animales, particularmente de uva (Williamson *et al.*, 2007); *Phyllosticta citricarpa*, agente causal de la enfermedad “mancha negra de los cítricos” (Martínez-Minaya *et al.*, 2015).

Para evaluar ambos métodos se utilizaron cepas productoras de AMPs *E. coli Rosetta Gami* transformadas con vectores con promotor T7 inducible con IPTG. Los AMPs producidos fueron: EcDf1 defensina de ceibo (Rodríguez Decuadro *et al.*, manuscrito en preparación), PdSN1 esnaquina de ibirapitá (Rodríguez Decuadro *et al.*, 2018) y MiDf6 defensina de congrosa (analizada en este trabajo, *contig* MiDN6861). Se expresaron como proteínas de fusión Trx:AMP:HisTag (construcción en vector pET102D, siendo AMP = MiDf6, EcDf1 o PdSN1) e HisTag:Trx:MiDf6 (construcción en vector pET32c). Las cepas se seleccionaron para la optimización de los ensayos porque todos los péptidos purificados demostraron previamente tener actividad contra *A.niger*; EcDf1 y PdSN1 además fueron activos contra *C.albicans* y *B.cinerea*; y PdSN1 también contra *S.aureus* y *Cmm*.

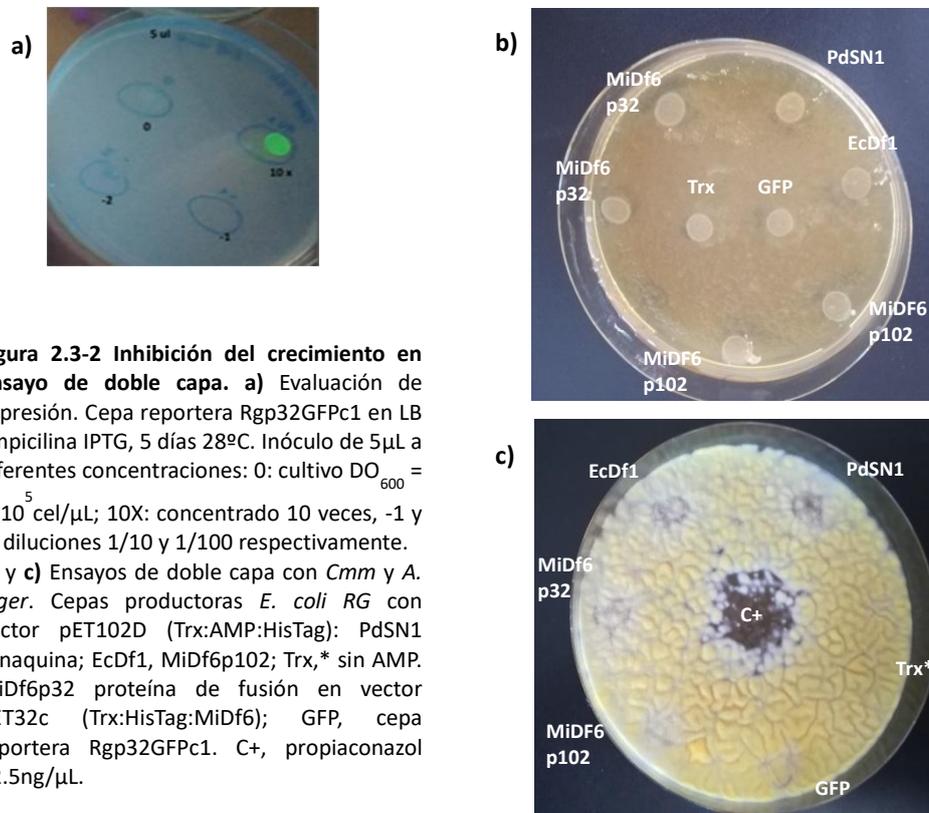
### 2.3.2a. Ensayos de doble capa en medio sólido.

Este ensayo consiste en sembrar en medio sólido la cepa productora y luego agregar una sobre capa de medio semisólido con una suspensión de concentración conocida del microorganismo blanco. Se analizó la actividad contra *A. niger*, *C. albicans*, *Cmm* y *S.aureus*. Se incluyeron en el análisis, además de las cepas productoras de AMPs mencionadas arriba, una cepa productora de tiorredoxina sin AMP (Trx\*, Trx:40aa:HisTag) y una cepa reportera *E. coli* RG (Rgp32GFPC1) transformada con el vector p32GFP que expresa GFP (*Green Fluorescent Protein*, Correa et al., 2014).

El ensayo debió ser optimizado en función de las velocidades de crecimiento e inóculos de los microorganismos blanco, la forma de siembra de la cepa productora (gota, línea, ansa), volúmenes (5 a 20  $\mu\text{L}$ ) y concentraciones de las mismas (cultivo DO=0.5, concentrado 10 veces y diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ; Materiales y métodos). También se analizó la inducción de la producción del péptido en medio sólido y duración de la misma ya que los tiempos de crecimiento de los hongos son de varios días y para que el ensayo sea válido es necesario que el péptido se exprese durante todo este tiempo. Para estas etapas se utilizó la cepa reportera Rgp32GFPC1 que permite seguir por fluorescencia el comportamiento de la bacteria productora y la influencia de la doble capa en el crecimiento. Se determinó que el mejor método de siembra es por gota de 5  $\mu\text{L}$  de una suspensión de  $5 \times 10^6$  cel/ $\mu\text{L}$  (cultivo 10X). La sobre capa no afectó ni la inducción ni el crecimiento de la cepa productora y la expresión en placa continuó hasta 5 días luego de la siembra (Figura 2.3-2a).

Se corroboró también la capacidad de crecimiento de los microorganismos blanco a 28°C, que es la temperatura de producción de los AMPs (Sección 2.2 y trabajos previos). Como el medio de cultivo contiene ampicilina para mantener el plásmido, se evaluó si ésta difunde a la sobre capa semisólida (sin ampicilina) y afecta el crecimiento del microorganismo blanco. Se comprobó que el tiempo de incubación del ensayo es suficiente para que la ampicilina difunda a la sobre capa inhibiendo el crecimiento de las especies bacterianas. Por esta razón, en paralelo se indujo la producción de GFP en medios sin ampicilina y no se observó fluorescencia, por lo que el antibiótico no puede ser eliminado del ensayo. Finalmente, la ampicilina se agregó al inóculo de la cepa reportera antes de la siembra sobre un medio sólido libre de antibiótico, de manera que

el mismo se encuentre únicamente en esta zona. Con esta modificación, se obtuvo crecimiento en la sobre capa de las bacterias *S. aureus* (resultado no mostrado) y *Cmm* (Figura 2.3-2b) y fluorescencia durante todo el tiempo del ensayo.



**Figura 2.3-2 Inhibición del crecimiento en ensayo de doble capa.** a) Evaluación de expresión. Cepa reportera Rgp32GFPc1 en LB ampicilina IPTG, 5 días 28°C. Inóculo de 5µL a diferentes concentraciones: 0: cultivo  $DO_{600} = 5 \times 10^5$  cel/µL; 10X: concentrado 10 veces, -1 y -2 diluciones 1/10 y 1/100 respectivamente. b) y c) Ensayos de doble capa con *Cmm* y *A. niger*. Cepas productoras *E. coli* RG con vector pET102D (Trx:AMP:HisTag): PdSN1 esnaquina; EcDf1, MiDf6p102; Trx,\* sin AMP. MiDf6p32 proteína de fusión en vector pET32c (Trx:HisTag:MiDf6); GFP, cepa reportera Rgp32GFPc1. C+, propiaconazol 62.5ng/µL.

Una vez estandarizadas las condiciones se realizó el ensayo con cepas productoras de AMPs contra las bacterias, *C.albicans* y *A.niger*. Luego de la incubación no se observó inhibición del crecimiento de *Cmm*, *S.aureus* y *C.albicans* (resultados no mostrados) con ninguna de las cepas productoras.

En los ensayos con *A. niger* se observaron halos de inhibición del crecimiento en las zonas correspondientes a las cepas productoras de AMPs (Figura 2.3-2c). Se observó crecimiento micelial pero hubo una inhibición del desarrollo marcada por un entlentecimiento de la conidiación.

En las zonas donde se sembraron las cepas control productoras de GFP y Trx\* (ambas sin AMPs) se observó la coloración normal de las conidias en desarrollo. Si bien las actividades no fueron tan marcadas como en los ensayos previos con los péptidos purificados. El halo de inhibición fue un poco mayor en la cepa productora de esnaquina

y se detectó un poco más actividad en la construcción en el vector pET32c en comparación a la de pET102D en la defensina MiDf6.

### **2.3.2b. Ensayo en medio líquido.**

Estos ensayos pueden considerarse como CIM modificadas, en los que los péptidos purificados se sustituyen por células bacterianas productoras de los péptidos a analizar. En este caso, se sembraron células sonicadas (lisadas) y sin sonicar previamente cultivadas en las condiciones donde se obtuvo mayores niveles de expresión (Sección 2.2.2 y trabajos previos). Se realizaron diluciones seriadas al medio de las células y se enfrentaron a los microorganismos blanco para determinar si existe inhibición del crecimiento luego de la incubación (Materiales y métodos). Las proteínas incluidas en el ensayo fueron Trx-AMP-HisTag (AMP = MiDf6, EcDf1) e HisTag-Trx-MiDf6. Como control se utilizaron células no inducidas. Los microorganismos blanco fueron los mismos que en la sección anterior y se agregaron *B. cinerea* y *P. citricarpa*. Previamente se determinó el tiempo requerido para visualizar crecimiento de cada microorganismo blanco en las condiciones del ensayo, siendo de 24hs para *Cmm*, *S. aureus* y *C. albicans*, 40hs para *A. niger*, 5 días para *B. cinerea* y 7 días para *P. citricarpa*.

Luego de transcurrido el tiempo de incubación no se observó actividad ni en bacterias, ni en *C. albicans*. En hongos filamentosos en las primeras dos diluciones hubo inhibición de crecimiento en todas las muestras, incluso en la no inducida (Figura 2.3-3). Esto pudo deberse a que en las muestras existan componentes que interfieran en el crecimiento de los microorganismos blanco, como por ejemplo restos de ampicilina del medio de cultivo, imidazol del buffer de lisis, u otras proteínas propias de *E.coli*. El experimento, por lo tanto, pudo analizarse a partir de la tercera dilución donde se observaron diferencias entre los cultivos no inducidos e inducidos.

En estos últimos, en las alícuotas lisadas hubo una sutil disminución del crecimiento con respecto a las muestra con células enteras indicando que es necesario realizar este tratamiento para observar mayor actividad, es decir liberar la proteína al exterior celular. Al igual que en ensayos anteriores, se observó mayor actividad en las células transformadas con la construcción en pET32c en comparación a la en pET102D para MiDf6. El método permitió visualizar la actividad de EcDf1 contra los hongos ensayados

pero no resultó con la sensibilidad suficiente para mostrar la actividad inhibitoria de *C.albicans* y *Cmm*.

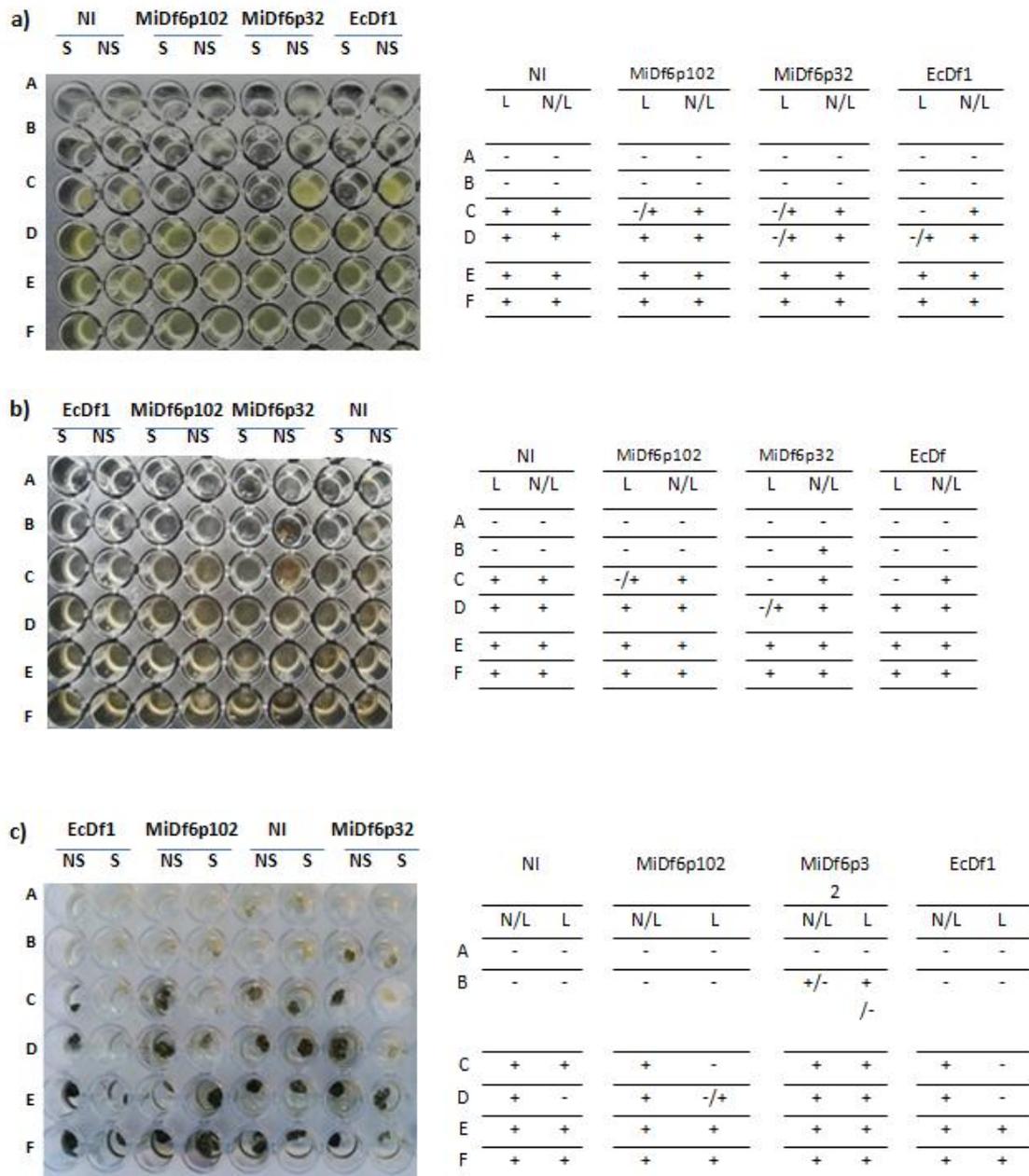


Figura 2.3-3 Ensayo de actividad en medio líquido. Microorganismos blanco: a) *A. niger*; b) *B. cinerea*, c) *P. citricarpa*. Cepas productoras *E. coli* RG: MiDf6p102, proteína de fusión en pET102 D (Trx:MiFf6:HisTag); MiDf6p32 proteína de fusión en pET32c (Histag:Trx:MiDf6); EcDf1: defensina de ceibo (Trx:MiFf6:HisTag). NI: cultivo no inducido. L y NL: células lisadas y no lisadas respectivamente. Los símbolos +, -, +/- y -/+ corresponden a crecimiento igual al control, no crecimiento y menor crecimiento que el control

### 2.3.3. Análisis y discusión de los métodos de *screening*

Los métodos de doble capa de agar (Sección 2.3.1) y cultivo líquido sonicado (Sección 2.3.2) permitieron visualizar cierta inhibición del crecimiento de los hongos filamentosos ensayados. En las condiciones ensayadas no se observó inhibición de *C. albicans*, *Cmm* y *S. aureus*, actividad previamente demostrada de los péptidos EcDf1 o PdSN1, purificados como AMP-HisTag (sin Trx).

En estos experimentos, los péptidos no se encuentran en condiciones que favorezcan su actividad. Por un lado, la cantidad presente en cada ensayo está limitada por el desarrollo celular y a la cantidad de péptido producido por esas células. MiDf6, EcDf1, y PdSN1 se producen mayoritariamente en cuerpos de inclusión (Sección 2.2 y trabajos previos) donde las proteínas se encuentran mal plegadas o desnaturalizadas y por lo tanto inactivas. En los experimentos de actividad con los péptidos sin purificar, solamente se está evaluando la porción soluble que además, debe ser liberada al medio. La mayor actividad observada en muestras sonicadas respecto a las mismas muestras a célula entera, indica la retención dentro de la célula. Es decir que la cantidad de péptido que efectivamente alcanza al microorganismo blanco es baja y sin duda muy inferior a la presente en los ensayos de MIC donde se usan péptidos purificados.

Otro factor importante es que en estos ensayos se evalúa la actividad de proteínas de fusión o sea los péptidos ligados a tiorredoxina y a la etiqueta de histidinas. En trabajos previos con los péptidos purificados EcDf1 y PdSN1, se observó que la actividad aumenta al eliminar la tiorredoxina de la proteína de fusión Trx-AMP-HisTag. Teniendo en cuenta entonces, que en este tipo de ensayos se subestima la actividad de los péptidos en estudio, los resultados obtenidos indican que tanto el método de doble capa como el de medio líquido lisado permiten identificar (previo a purificación) aquellos AMPs con actividades “fuertes”, es decir cuando la proteína de fusión mantiene la capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos blanco a concentraciones relativamente bajas. La ausencia de inhibición en estas condiciones no indica ausencia de actividad de péptido. De hecho, los valores de inhibición (IC50) obtenidos para los péptidos purificados (AMP-HisTag) fueron en PdSN1 1.8, 1.7 y 1.2  $\mu\text{M}$  para *S. aureus*, *Cmm* y *C. albicans* respectivamente (Rodríguez Decuadro *et al.*, 2018); 0.16  $\mu\text{M}$  en EcDf1 para *C. albicans* (Rodríguez Decuadro *et al.*, manuscrito en preparación). Estos valores

son comparables a los reportados en biografía para otros AMPs (0.02-2  $\mu\text{M}$ ) y están en el mismo orden que los obtenidos para *A.niger* (1.4 y 0.14  $\mu\text{M}$ ) para PdSN1 y EcDf1 respectivamente), por lo tanto, es necesario realizar mayores esfuerzos que permitan establecer las condiciones óptimas de los ensayos con estos microorganismos.

En el caso de MiDf6, mostramos que la actividad es más visible cuando está como HisTag-Trx-Midf6 (plásmido pET32c) que como Trx-MiDf6-HisTag (plásmido pET102D) en el *screening* en placa y en medio líquido (Sección 2.3.2) y también la de Histag-Trx-MiDf6 respecto a MiDf6-HisTag (MIC con péptidos purificados, Sección 2.2), lo que indica la importancia de que el péptido esté libre en el extremo C-terminal.

Comparando los métodos, ambos requieren una optimización rigurosa previa al ensayo para cada microorganismo blanco (tiempo, inóculo, temperatura de crecimiento) y cepa productora (tiempo y temperatura para la expresión). En medio sólido se requiere además evaluar la influencia de la doble capa en el crecimiento del microorganismo blanco y tiene la complicación adicional de la presencia de ampicilina (como presión de selección) que debe ser controlada. Por otra parte, el ensayo de cultivo líquido lisado, si bien insume más tiempo debido a la preparación de las muestras (cultivo y sonicado), permite evaluar mayor cantidad de péptidos en menor volumen, y comparar el efecto de diferentes muestras de forma más objetiva (en función de la dilución en la que se vea inhibición).

El método de doble capa podría mejorarse produciendo las proteínas de interés de manera extracelular, utilizando una construcción donde la proteína de fusión esté unida a una señal de secreción de *E.coli*. Existen algunos ejemplos en la bibliografía como el péptido OmpA que si bien no se ha usado para la expresión de AMPs, ha permitido obtener buenos rendimientos en la producción heteróloga de la enzima quitosanasa (Csn) de *Bacillus subtilis* (Pechsrichuang *et al.*, 2016). Zamani y colaboradores (2015) realizan un estudio *in silico* con varios péptidos de secreción de *E.coli* que permiten seleccionar el más adecuado en función de la molécula a producir. Ambos trabajos pueden ser interesantes como punto de partida para obtener péptidos antimicrobianos en el espacio extracelular. De todas formas sería necesario realizar una nueva optimización experimental de las condiciones de producción (tiempo, temperatura, cepas, relación entre fracción soluble/insoluble, etc) así como influencia del péptido

señal en la actividad y condiciones de clivado del mismo, rendimientos, etc, para determinar entonces si amerita realizar este cambio de estrategia para la expresión.

Por lo mencionado arriba, el ensayo en medio líquido sería la estrategia más recomendada para una selección primaria (previo a la purificación y producción) de aquellos AMP con actividad “fuerte” contra hongos filamentosos, permitiendo analizar simultáneamente mayor cantidad de péptidos y de microorganismos blanco.

# Capítulo 3

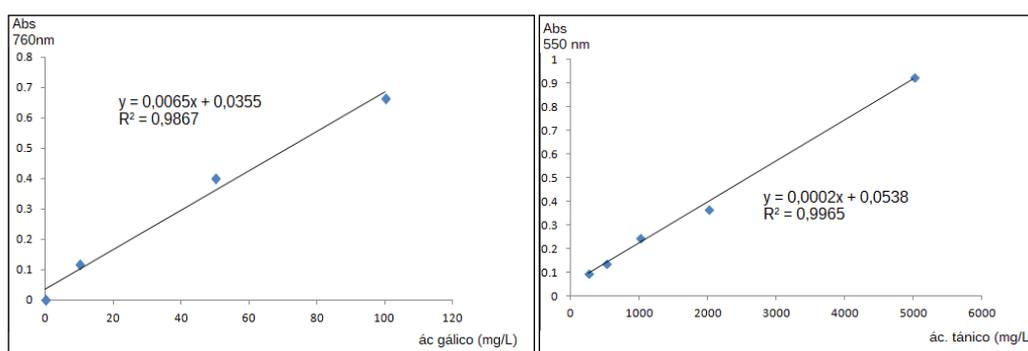
## Resultados compuestos fenólicos

---

## 3.1 Extracción química de compuestos fenólicos

Para la extracción de compuestos fenólicos se utilizó la madera de la especie *Gleditsia triachantos L* (acacia negra o de tres espinas), colectada en Cerro Largo en setiembre de 2015. Dicha especie es originaria de Estados Unidos, invasora del monte nativo, conocida por su madera oscura y de alta durabilidad natural. Una porción de la madera fue utilizada para determinar la edad (individuo de 55 años) por dendrocronología (Laboratorio Forestal del CUT) y otra porción fue secada al aire durante 48 horas. De la muestra seca se separaron albura, corteza y duramen y se trituraron con molino triturador hasta obtener una granulometría de 0,400 mm (malla 40).

La variabilidad estructural de los compuestos fenólicos presentes en la madera, tanto entre especies como dentro de una misma especie, hace casi imposible que exista un único método optimizado para la extracción, dicho proceso debe ser estandarizado caso a caso. La elección del solvente, tipo de muestra y temperatura adecuada representan un punto clave en los resultados del extracto obtenido, por esta razón se realizó un primer ensayo para determinar las mejores condiciones de extracción que permitieran obtener muestras con actividad antimicrobiana *in vitro*.



**Figura 3.1-1. Curvas de calibración.** Izquierda: curva con ácido gálico para cuantificación por Abs 760 nm de fenoles totales. Derecha curva con ácido tánico para cuantificación de taninos hidrolizables por Abs a 550nm. En ambos gráficos se indica la ecuación de la recta y el valor  $R^2$  de linealización.

La madera pulverizada (albura, corteza y duramen) se extrajo según Naima y colaboradores (2015) los parámetros evaluados fueron temperatura, solvente, tiempo y método de extracción (Materiales y métodos). En esta instancia se obtuvieron 30 muestras por duplicado (de aquí en más extractos). Como una primera caracterización se determinaron las concentraciones de taninos condensados, hidrolizables y fenoles totales espectrofotométricamente (Materiales y métodos). Para fenoles totales y taninos hidrolizables se realizaron curvas de calibración con ácido gálico y ácido tánico (Figura 3.1-1) y los valores se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por g de madera (mg GAE/g), y mg de equivalentes de ácido tánico por gramo de madera (mg TAE/G) respectivamente (Tabla 3.2-1). El contenido de taninos condensados se expresó como mg de equivalentes de cianidina por gramo de madera (mg CyaE/g) (Tabla 3.2-1). Luego de realizar las medidas los solventes se evaporaron a presión reducida y se determinó el peso seco de cada muestra para calcular el rendimiento. En las extracciones en agua fue  $11.8 \pm 1.2$  mg/g madera y en compuestos orgánicos  $23.3 \pm 2.4$  mg/g independientemente de la temperatura o método de extracción (Tabla A5, Anexo 5).

## 3.2 Selección de extractos en función de la actividad contra hongos xilófagos

---

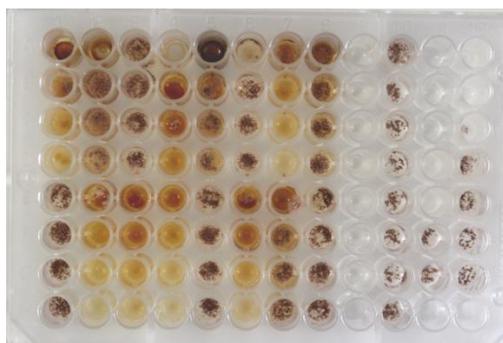
La actividad antimicrobiana se evaluó contra hongos degradadores de madera: dos de pudrición marrón (*Gloeophyllum trabeum* y *Laetiporus sulphureus*) y dos de la pudrición blanca (*Punctularia atropurpurascens* y *Phanerochaete chrysosporium*). Estos organismos son los principales descomponedores de madera pero tienen diferentes sistemas enzimáticos y mecanismos de acción, por lo tanto es importante que el extracto seleccionado tenga actividad contra ambos tipos de hongos. Los de pudrición marrón degradan completamente la celulosa y hemicelulosa de la madera pero no la lignina, sin embargo los de pudrición blanca son capaces de mineralizar la lignina casi por completo (Worrall *et al.*, 1997).

Previo al ensayo de actividad antimicrobiana, se realizó una puesta a punto del tiempo y temperatura óptima de crecimiento y formación de conidios en medio sólido y líquido de cada microorganismo. Las condiciones óptimas fueron 5-7 días de incubación a 28°C para todos los hongos, excepto *G. trabeum* que, si bien tuvo un buen crecimiento micelial en estas condiciones, la formación de conidios se produjo en condiciones de microaerobiosis y menor concentración de extracto de malta durante 3 semanas de incubación a 28°C.

La actividad antimicrobiana se realizó con los extractos retomados en agua (concentración 10 mg/ml) para seleccionar aquellos que fueran eficaces en la inhibición del crecimiento de los cuatro hongos testeados. Se evaluaron el método de difusión en placa con discos de papel (Vek *et al.*, 2013) y el ensayo de CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) en placa de 96 pocillos (Tiozzo *et al.*, 1998). El primero consiste en sembrar un disco de papel, donde previamente se adsorbió el extracto a testear a diferentes concentraciones, sobre un medio sólido inoculado con conidios del microorganismo blanco. La actividad se determina por aparición de halo de inhibición del crecimiento respecto al control sin extracto luego del tiempo de incubación, se selecciona la menor concentración donde se observe un halo significativo. El segundo

método consiste en enfrentar a los hongos en medio líquido (placa de 96 pocillos) a diluciones seriadas al medio de los extractos. Se determina la concentración inhibitoria mínima como la mínima concentración donde se observa inhibición/disminución del crecimiento con respecto al control sin extracto luego de la incubación. La inhibición del crecimiento se determina en comparación a los controles sin extracto. De los dos métodos analizados, la técnica de dilución en placa (CIM) resultó más rápida, permitió analizar más extractos en cada ensayo y requirió menos gasto de los mismos por lo que fue seleccionado para continuar trabajando

Se estandarizaron las concentraciones de conidios y de fungicidas usados como control (benomil y sulfato de cobre) que permitieran ver crecimiento luego de la cuarta o quinta dilución. Para esto se realizaron diferentes inóculos de conidios que se enfrentaron a diluciones seriadas de los fungicidas. La mínima concentración de conidios sin fungicida donde se observó crecimiento luego de 5 días de incubación fue  $1.5 \times 10^4$  con/ml y las concentraciones de fungicidas seleccionadas, según el criterio mencionado arriba, fueron 6g/L para benomil y 2g/L para sulfato de cobre. Con estas condiciones (fungicidas y conidios) se realizaron los ensayos de MIC con todos los extractos contra los cuatro hongos, se incubaron 5 días a 28°C (Figura 3.2-1, ensayo con *P.atropurpurascens*).



CI 2Et	DI 2Et	AI 2Et	CI 6Et	DI 6Et	AI 6Et	CM 2Et	DM 2Et	PDB	C	Cu SO <sub>4</sub>	B
-	-	+	-	-	+	+/-	-	-	+	-	-
-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+/-
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
AM 2Et	DM 2Me	CM 2Me	CM 2Ac	AM 2Ac	CM 6Ac	DM 6Ac	AM 6Ac	-	+	-	+
+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	nd	nd

**Figura 3.2-1. Ensayo de CIM con algunos extractos enfrentados a *P. atropurpurascens* luego de 5 días de incubación.** Izquierda foto placa 96 pocillos. Derecha resultados de la placa. CI2Et, DI2Et, AI2Et: corteza, duramen y albura infusión 2 hs etanol; CI6Et, DI6Et, AI6Et: corteza, duramen y albura infusión 6hs etanol; CM2Et, DM2Et, AM2Et: corteza, duramen y albura maceración 2hs etanol; DM2Me, CM2Me: duramen y corteza maceración 2 horas metanol; CM2Ac, AM2Ac: corteza y albura mortereado 2 hs agua; CM6Ac, DM6Ac, AM6Ac: corteza, duramen y albura mortereado 6hs agua; PDB control de medio de cultivo sin inocular; C control de crecimiento de conidios sin extracto. CuSO<sub>4</sub>: fungicida (2mg/ml); B: fungicida benomil (6mg/ml). El símbolo + indica crecimiento igual al control, - sin crecimiento, +/- crecimiento menor al control.

Cuando los hongos se enfrentaron a las muestras obtenidas a partir de albura no hubo inhibición o disminución del crecimiento evidente en ningún caso. Así mismo las medidas espectrofotométricas presentaron valores de absorbancia nulos o por debajo de 0.1 en estas muestras (Tabla A5, Anexo 5). Los resultados concuerdan con la bibliografía donde se señala que la albura no presenta cantidades significativas de compuestos fenólicos (Taylor *et al.*, 2002). En los pocillos donde se sembraron extractos obtenidos a partir de corteza y duramen se observó inhibición y/o disminución del crecimiento en la primera y/o segunda dilución dependiendo del extracto y del hongo y en todos los casos fue posible realizar la cuantificación de compuestos por medidas colorimétricas (Tabla 3.2-1). Ambos resultados indican que los compuestos fenólicos son indispensables para ejercer la actividad antimicrobiana, de todas formas no fue posible correlacionar una mayor actividad con una mayor concentración de compuestos fenólicos totales, taninos hidrolizables y/o condensados (Tabla A5).

**Tabla 3.2-1 Concentraciones de compuestos y valores de Mínima Concentración inhibitoria (MIC) de las 8 muestras que presentaron actividad contra los cuatro hongos ensayados.** FT: fenoles totales, TH: taninos hidrolizables, TC: taninos condensados. C: corteza. D: Duramen. A: Albura. M: mortereado o maceración según el caso. 2 y 6: tiempos de extracción en hs. Ac: solvente agua, Et: solvente etanol, Me: solvente metanol, C+: Benomil, P.a: *P.atropurpurascens*, P.ch: *P. chrysosporium*, G.t: *G. trabeum*, L.s: *L. sulphureus*

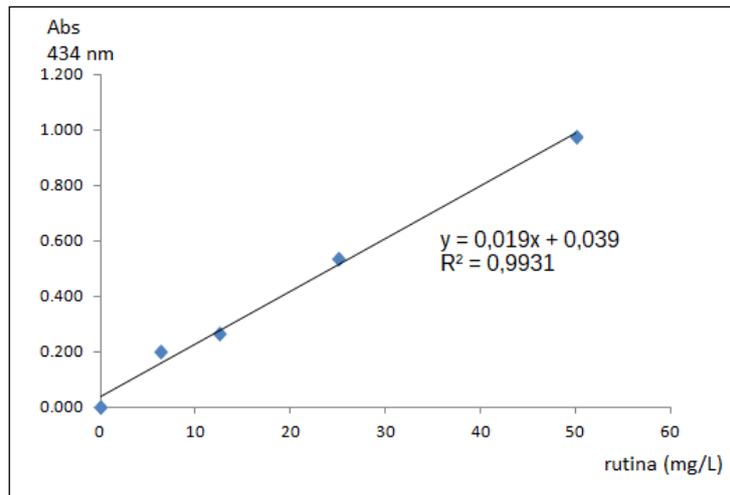
Muestra	Cuantificaciones			CIM (mg/mL)							
	FT (mg GAE/g) U=40	TH (mg TAE/g) U=18,9	TC (mg CyaE/g) U=8.4	P.a		P.ch		G.t		L.s	
				E	C +	E	C+	E	C+	E	C+
CM2Ac	132	78.3	14.8	1	3	10	3	5	1.5	10	1.5
				0							
CM2Me	397	273.6	58.1	1	3	10	3	5	1.5	10	1.5
				0							
CI2Et	280	184.1	41.1	5	3	10	3	5	1.5	10	1.5
CI6Et	398	260.9	54.2	1	3	10	3	5	1.5	10	1.5
				0							
DI2Et	380	301.6	79.2	1	3	5	3	10	1.5	10	1.5
				0							
DI6Et	443	334.4	85.0	1	3	5	3	10	1.5	10	1.5
				0							
CI2Me	364	125.6	17.4	5	3	10	3	5	1.5	10	1.5
DI2Me	333	321.4	56.5	1	3	10	3	10	1.5	10	1.5
				0							

Se seleccionaron ocho extractos que mostraron actividad contra los cuatro hongos analizados. Estos fueron los obtenidos por infusión de corteza y duramen en etanol durante 2 y 6 horas (CI6Et, DI6Et, DI2Et, CI2Et) y metanol durante 2 horas (CI2Me, DI2Me), maceración de corteza en metanol (CM2Me) y mortereado de corteza en agua durante 2 horas (CM2Ac). La mayoría fueron obtenidos por infusiones en etanol (cuatro) y a partir de corteza (cinco). Estos resultados indican que el método de extracción y la muestra inicial son variables importantes para obtener en los extractos moléculas que se relacionan con la inhibición del crecimiento en las condiciones ensayadas.

### **3.2.1. Fraccionamiento de extractos seleccionados**

Con el fin de enriquecer las muestras en los compuestos de interés se repitieron las extracciones en las ocho condiciones seleccionadas y luego se realizó un fraccionamiento por extracciones sucesivas con dietíl-éter según Naima y colaboradores (2015). Se busca que oligómeros menos polares como proteínas, ácidos grasos, resinas, etc., se recojan en la fase orgánica y los compuestos fenólicos en la acuosa.

Previo a la extracción se realizó la cuantificación espectrofotométrica de los compuestos analizados en la sección 3.1 y además la de flavonoides por reacción con cloruro de aluminio, medida espectrofotométrica a 434 nm (Dr. Álvaro Vázquez, Facultad de Química, UdelaR com. pers.; Materiales y métodos). Para esta última serie de medidas se realizó una curva de calibración con rutina, el contenido de flavonoides se expresó como equivalentes en miligramos de rutina por gramo de madera (mg RutE/g; Figura 3.2-2, Tabla 3.2-2). Los solventes se evaporaron a presión reducida, el residuo de la fase orgánica se retomó en metanol y el de la fase acuosa en agua (concentraciones 10mg/mL).



**Figura 3.2-2. Curva de calibración con rutina para la determinación de flavonoides por absorbancia a 434 nm.** Se indica la ecuación de la recta y el valor  $R^2$  de normalización.

Los extractos en ambas fases (orgánica y acuosa) se volvieron a enfrentar a los cuatro hongos xilófagos mediante el ensayo de MIC, en los ensayos con la fase orgánica se agregó un control con metanol. Las fracciones orgánicas no presentaron actividad contra ninguno de los hongos. En la mitad de los extractos acuosos se obtuvieron valores de CIM mayores o pérdida de actividad contra alguno de los cuatro hongos. En los extractos CI2Me, CM2Me, CI6Et la MIC se mantuvo o disminuyó entre dos y cuatro veces dependiendo del hongo (no mostrado). Únicamente DI6Et tuvo actividad contra *L. sulphureus* y el valor de MIC fue la mitad que el obtenido previo a la extracción (Tabla 3.2-2). En los extractos cuya actividad aumentó con respecto al primer ensayo este valor estuvo entre 10 y 1.25 mg/ml, dependiendo de la especie de hongo y el extracto. Nuevamente no se pudo relacionar la concentración de compuestos con la actividad antimicrobiana.

Estos resultados indican que la acción antimicrobiana podría deberse a un efecto sinérgico entre mezclas de compuestos en los extractos y que las moléculas que se extrajeron en la fase orgánica, son importantes para dicha sinergia aunque no son activas *per se*.

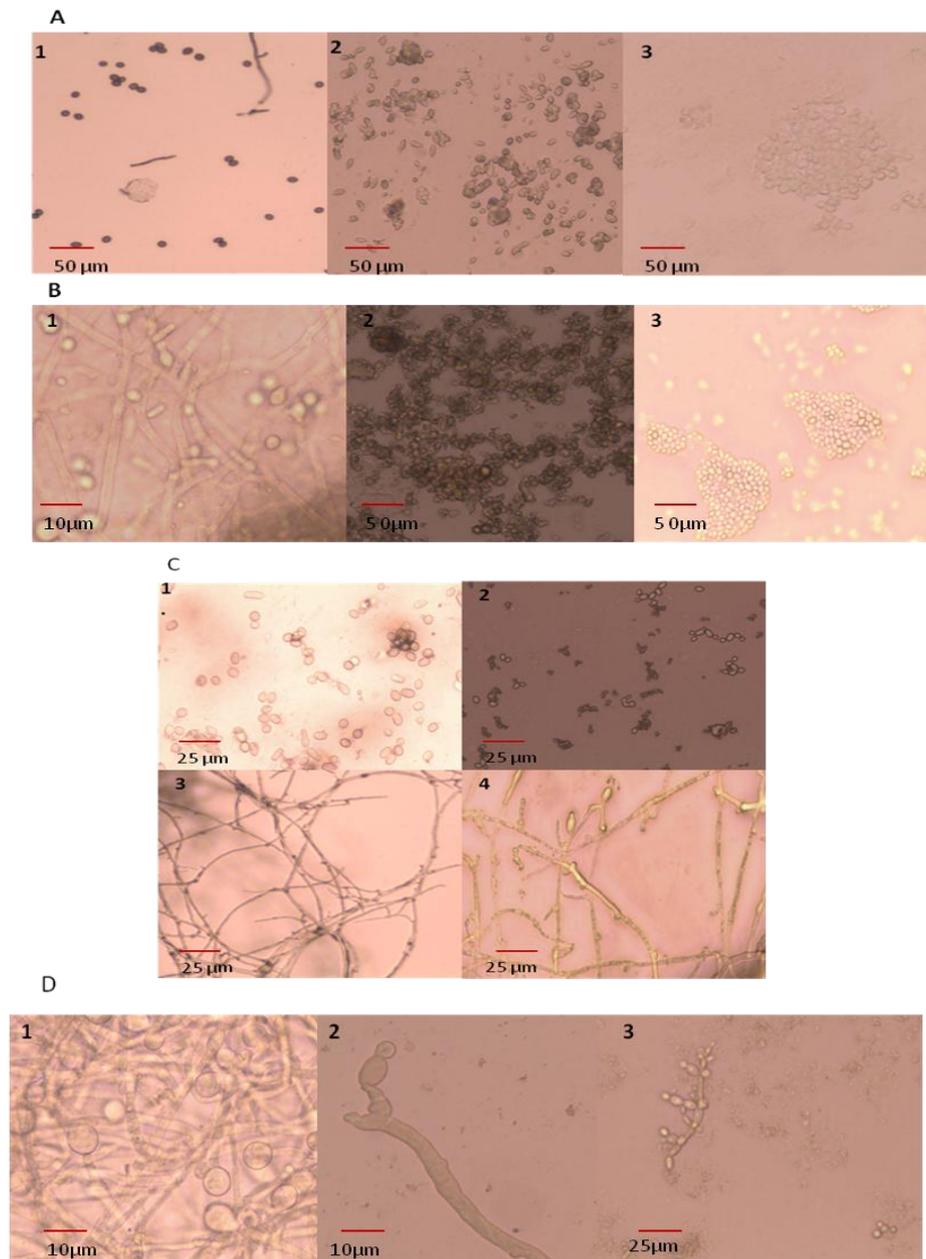
**Tabla 3.2.-2 Valores de CIM (mg/ml) antes (A/F) y después de fraccionamiento (F) con dietil-éter para los extractos enfrentados a los cuatro hongos analizados.** En negrita se observan extractos con actividad aumentada. El símbolo – corresponde a extractos donde no se observó actividad.

Muestra	<i>P. atropurpurascens</i>		<i>P. chrysosporium</i>		<i>G. trabeum</i>		<i>L. sulphureus</i>	
	A/F	F	A/F	F	A/F	F	A/F	F
CM2Ac	10	-	10	10	5	10	10	-
DI2Me	10	10	5	-	10	-	10	-
<b>CI2Me</b>	5	5	10	5	5	1.25	10	-
<b>CM2Me</b>	10	10	10	2.5	5	2.5	10	-
<b>DI6Et</b>	10	5	10	10	10	2.5	10	5
<b>CI6Et</b>	10	2.5	10	5	5	1.25	10	-
CI2Et	5	10	10	10	5	-	10	-
DI2Et	10	-	5	5	10	10	10	-

Si bien es preferible que un futuro producto comercial esté formado por mezclas simples es sabido que, principalmente en corteza, las resinas, ácidos grasos y otros componentes juegan un rol importante en la protección antimicrobiana. Se podría afirmar entonces, que la extracción con dietil-éter no es una buena estrategia ya que en la mayoría de los casos la actividad se vio afectada.

### 3.2.2 Visualización del efecto antimicrobiano

Alícuotas de los cultivos enfrentados a los cuatro extractos cuya CIM disminuyó luego del fraccionamiento se visualizaron al microscopio óptico y se reaislaron en placas de PDA para determinar efecto fungicida o fungistático.



**Figura 3.2-3** Imágenes obtenidas en microscopio óptico de ensayos CIM (40X). A) *G. trabeum*. 1. Esporas antes de la incubación con extractos. 2 y 3. Esporas luego cinco días de incubación con la fase acuosa del extracto CI2Me luego de fraccionamiento con dietil-éter. B) *P. chrysosporium*. 1. Crecimiento luego de cinco días de incubación sin extracto. 2 y 3 crecimiento luego de 5 días de incubación con la fase acuosa del extracto CM2Me luego de fraccionamiento con dietil-éter. C) *P. atropurpurascens*. 1. Esporas antes de la incubación con extractos. 2. Esporas luego cinco días de incubación con la fase acuosa del extracto CI6Et luego del fraccionamiento con dietil-éter. 3. Crecimiento luego de 5 días de incubación sin extracto. 4. Crecimiento luego de 5 días de incubación con la fase acuosa del extracto CI6Et luego del fraccionamiento con dietil-éter. D) *L. sulphureus*. 1. Crecimiento luego de 5 días de incubación sin extracto. 2 y 3 Crecimiento y esporas luego de 5 días de incubación con la fase acuosa del extracto DI6Et luego del fraccionamiento con dietil-éter.

Al microscopio se observó un efecto de agregación de esporas o/y sobre el crecimiento y morfología de hifas (Figura 3.2-3), no parecerían haber diferencias en el efecto producido y la naturaleza del extracto. Luego de 5 días de incubación, en los reislamientos se observó un crecimiento macro y microscópico normal en los 4 hongos por lo que se podría concluir que los extractos tienen efecto fungistático y no fungicida, a las concentraciones ensayadas.

## 3.3 Análisis exploratorio de datos

---

Para determinar si las muestras de madera permanecen inalteradas durante el tiempo transcurrido entre la primer y segunda extracción (3 meses) se realizó una prueba T para muestras emparejadas (valor P de dos colas y  $\alpha=0.05$ ) con los datos de concentraciones de compuestos fenólicos totales, taninos hidrolizables y condensado de los ocho extractos seleccionados en la sección 3.2. Dicha prueba permite determinar si existen diferencias significativas entre los valores obtenidos cuando la extracción se hace en las mismas condiciones y también comparar valores cuando se realiza algún cambio en el ensayo, como el fraccionamiento con dietíl-éter. Cuando el valor P obtenido en la prueba es menor a 0.05 las diferencias son significativas. Si bien estos datos pueden variar si se aumenta el número de réplicas (Prof. José Fuentes, Encargado del Laboratorio de Metrología y Control de Procesos de la Facultad de Química, com. pers; Materiales y métodos).

Los valores de P para fenoles totales, taninos condensados e hidrolizables no fueron significativos en ningún caso, ni luego de la segunda extracción, ni luego del tratamiento con dietíl-éter. Se puede afirmar que el ensayo es reproducible cuando las condiciones de extracción permanecen inalteradas y la muestra de madera se guarda en condiciones adecuadas (pulverizada, temperatura ambiente, humedad menor a 50%, oscuridad). Cabe destacar que el análisis estadístico se realizó para duplicados y como las variables aleatorias en muestras biológicas son muy grandes es posible que los resultados varíen si se aumenta el número de réplicas. El valor obtenido para la incertidumbre fue alto por la misma razón.

Por otro lado, la extracción con dietil-éter no afecta el contenido de estos compuestos en la mezcla. Sin embargo para flavonoides el valor P fue 0,0009, indicando que existe una variación significativa de estos compuestos en los extractos. Dicha variación no se correlacionó con la actividad antimicrobiana ya que en todos los casos se observó una disminución del contenido de flavonoides luego del tratamiento, sin importar si la actividad aumentó, disminuyó o se mantuvo igual (Tabla 3.3-1). Indicando que la actividad antimicrobiana contra los hongos analizados no se debe al contenido de flavonoides presentes en la muestra.

**Tabla 3.3-1. Contenido de fenoles totales (FT), taninos hidrolizables (TH), taninos condensados (TC) y flavonoides (FI) en las muestras seleccionadas en función de la actividad antimicrobiana contra los hongos luego de fraccionamiento con dietil-éter.** En negrita extractos con actividad aumentada. C: corteza, M: maceración o mortereado, I: infusión, 2 y 6 tiempo de extracción en hs, Ac: solvente agua, Et: solvente etanol, Me: solvente metanol. En flavonoides: AF antes fraccionamiento, F fraccionamiento con dietil-éter.

Muestra	FT (mgGAE/g)	TH (mgTAE/g)	TC (mg CyaE/g)	FI (mg RutE/g)	
	Pvalor=0.656	Pvalor=0.397	Pvalor=0.729	AF	F
CM2Ac	160±40	119.2±18.9	25±8.4	3.2±1.3	1.4±1.3
<b>CI6Et</b>	<b>338±40</b>	<b>335.6±18.9</b>	<b>69.1±8.4</b>	<b>3.1±1.2</b>	<b>1.4±1.2</b>
<b>DI6Et</b>	<b>409±40</b>	<b>362.6±18.9</b>	<b>69.0±8.4</b>	<b>7.2±1.8</b>	<b>4.6±1.8</b>
DI2Et	412±40	333.9±18.9	70.5±8.4	3.5±1.2	1.8±1.2
CI2Et	257±40	251.6±18.9	59.9±8.4	6.6±1.6	3.4±1.6
DI2Me	297±40	293.8±18.9	44.4±8.4	4.3±3.2	3.8±3.2
<b>CI2Me</b>	<b>375±40</b>	<b>203.3±18.9</b>	<b>55.0±8.4</b>	<b>5.8±1.8</b>	<b>1.3±1.8</b>
<b>CM2Me</b>	<b>470±40</b>	<b>315.3±18.9</b>	<b>54.9±8.4</b>	<b>3.8</b>	<b>1.2</b>

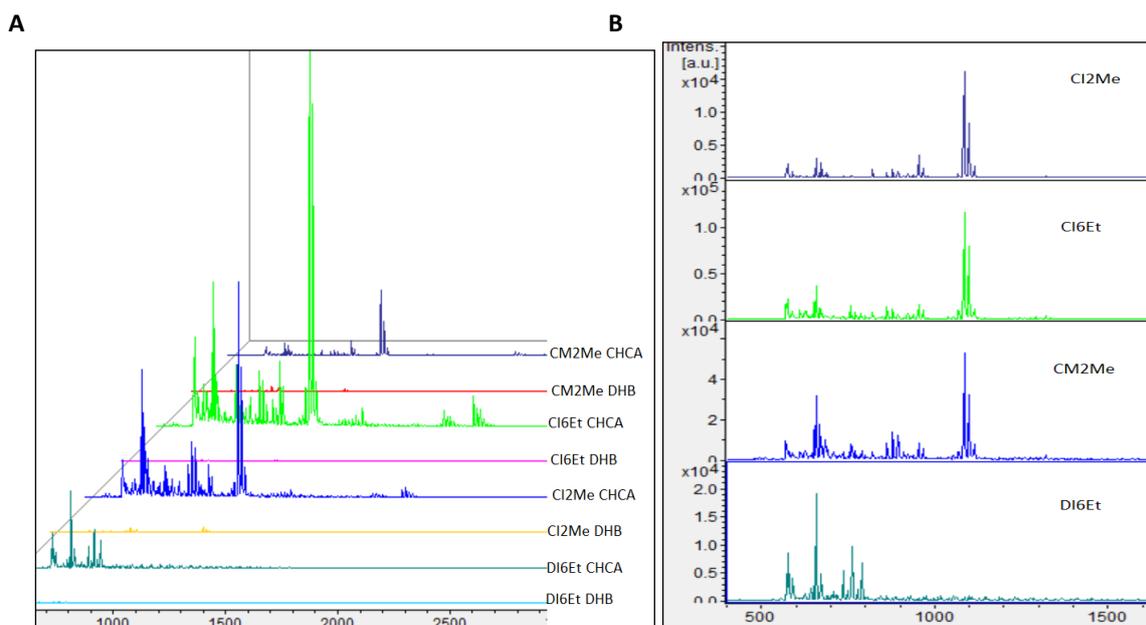
## 3.4 Análisis por MALDI-TOF

---

Para poder realizar una primera descripción de posibles compuestos presentes en las mezclas, los cuatro extractos cuya actividad antimicrobiana aumentó luego del fraccionamiento, fueron analizados por espectroscopia de masa MALDI TOF según Bianchi y colaboradores (2015) con modificaciones (Materiales y métodos). Estos ensayos se realizaron utilizando dos matrices comúnmente utilizadas para el análisis de este tipo de compuestos CHCA (ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinámico) y DHB (ácido 2,5-dihidroxi benzoico).

En una primera instancia, se realizó la comparación de los espectros obtenidos con las dos matrices y entre los obtenidos para cada una de las muestras en función de la forma, número de picos y nitidez de los mismos. Se observó que los espectros en DHB fueron menos nítidos y con menos número de picos en las cuatro muestras, el análisis posterior se realizó únicamente en los espectros en CHCA (Figura 3.4-1A). Al comparar los resultados entre las muestras se observó que las 3 muestras provenientes de corteza tuvieron espectros y valores de  $m/z$  muy similares entre sí, a diferencia de la muestra de duramen, si bien existieron picos y patrones que se repiten en las cuatro muestras (Figura 3.4-1 B).

Estudios previos de purificación y caracterización de compuestos obtenidos a partir de espinas de *Gleditsia sinensis* L. y de hojas de *Gleditsia triacanthos* L. han permitido identificar y aislar algunos de ellos con actividad antimicrobiana y antifúngica. Entre los compuestos identificados se encuentran derivados del ácido gálico, elágico, flavonoides y flavononas (Zhou *et al.*, 2007 b y c; Mohammed *et al.*, 2014). Se podría esperar entonces, que en las muestras analizadas en este trabajo estén presentes estos compuestos o derivados de los mismos. En todos los casos el análisis de los picos se basa en datos reportados en la bibliografía consultada que permitieron predecir posibles compuestos presentes en los extractos.



**Figura 3.4-1 Comparación de la forma y número de picos obtenidos en los espectros de masa. A)** Matrices DHB y CHCA. **B)** Comparación de espectros en CHCA de las 4 muestras.

En la zona del espectro entre 400 y 770 Da las cuatro muestras presentaron picos con  $m/z$  similares (Figura 3.4-2). El primer pico con un valor  $m/z$  de 434 se podría adjudicar a un residuo de ácido gálico (170 Da, Figura 3.4-5A) unido a 2 glucosas con escisión de tres grupos OH ( $170 + 2(180 - 16 \times 2)$ ) que posiblemente se vincule a la hidrólisis de un galotanino durante el proceso de extracción (Pizzi *et al.*, 2009). En un trabajo posterior Ricci y colaboradores (2016) atribuyen este valor de  $m/z$  a un residuo de ácido elágico (304 Da, Figura 3.4-5B) unido a esta tri-desoxiglucosa ( $304 + 132$ ). Según estos autores, el siguiente pico  $m/z$  de 573 podría corresponder tanto a un residuo de ácido gálico como a uno de ácido elágico ambos unidos a fragmentos de azúcares. Como se mencionó anteriormente, en extractos de especies del género *Gleditsia* fueron caracterizados tanto derivados del ácido gálico como del ácido elágico, por lo tanto, no es posible descartar ninguna de las dos hipótesis. En 650 Da se observó un pico que fue asignado por Ricci y colaboradores (2016) como HHDp-glucósido (precursor del ácido elágico, Figura 3.4-5C) y 656 Da podría adjudicarse a un monómero de tri-galoil glucosa (Figura 3.4-5D; Pizzi *et al.*, 2009). Las diferencias de 16 Da entre el pico en 573 Da y 589 Da; entre 650 Da y 666 Da; y entre 656 Da y 672 Da podrían deberse a hidroxilaciones sucesivas.

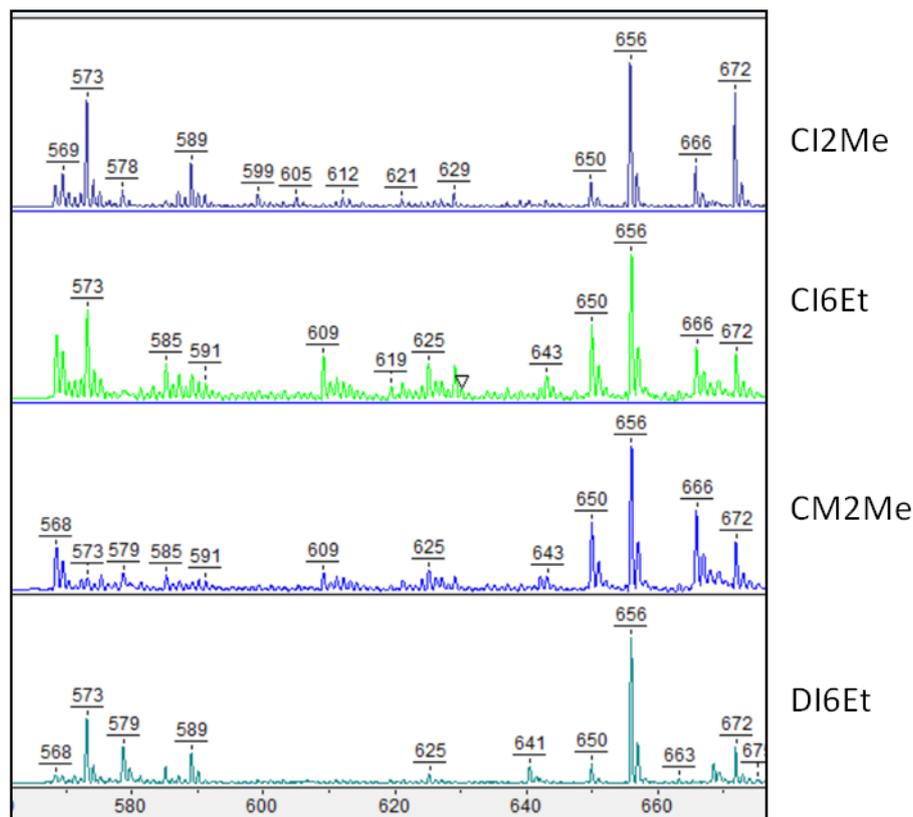
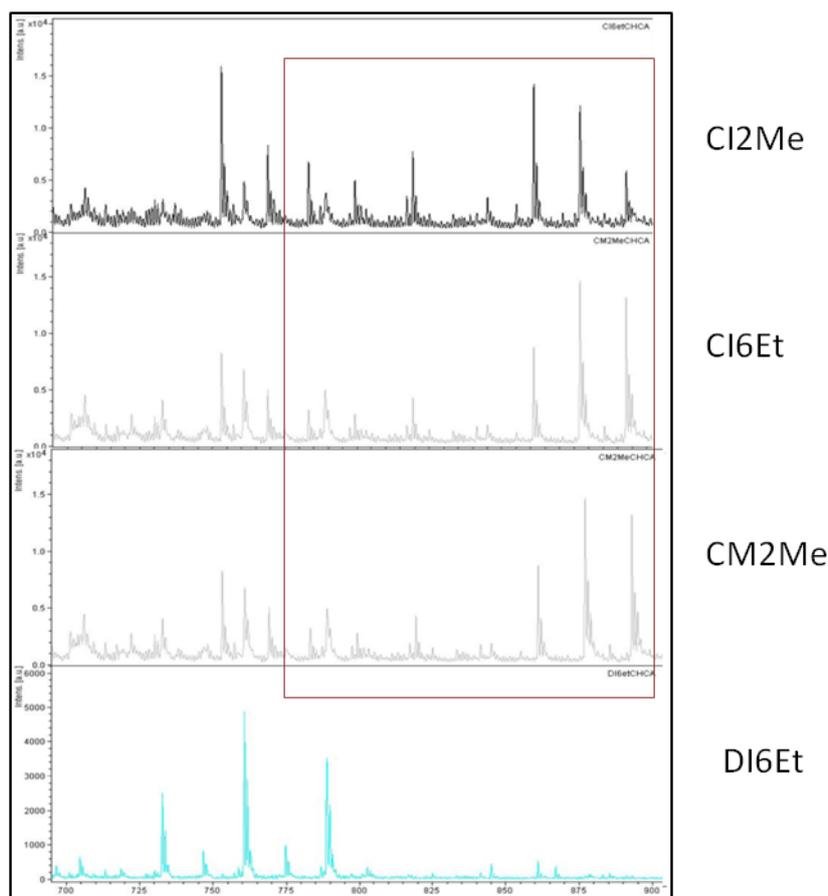


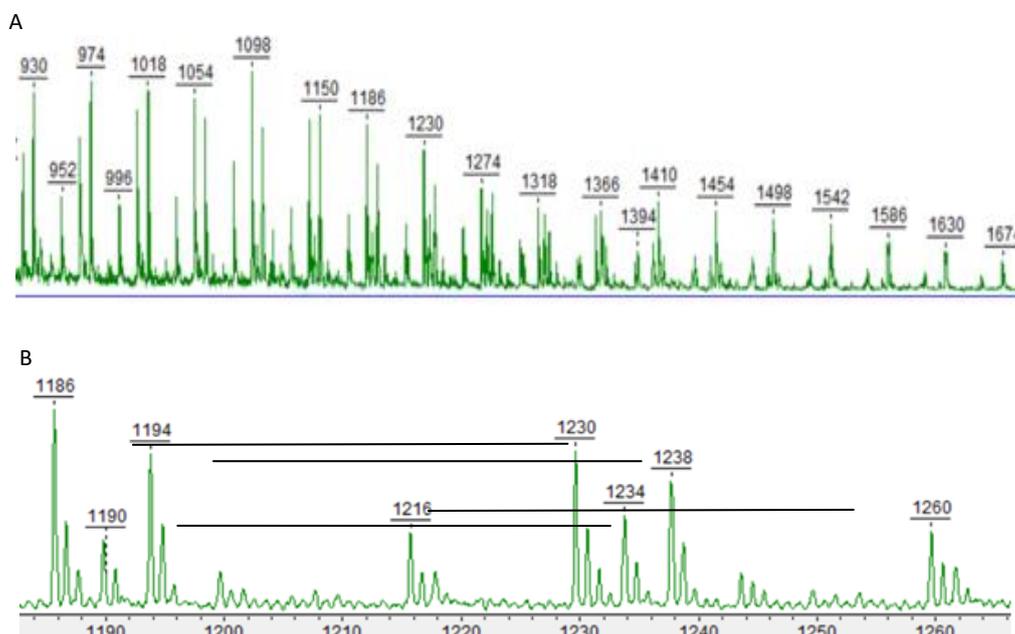
Figura 3.4-2. Zona del espectro de masa con valores  $m/z$  similares en las cuatro muestras. De arriba hacia abajo: CI2Me, CI6Et, CM2Me y DI6Et.

En valores de  $m/z$  por encima de 700 se observaron picos que corresponderían a repeticiones de unidades de flavonoides con diferentes grados de hidroxilación. En esta zona, existió una diferencia bien marcada entre los espectros obtenidos a partir de las muestras de duramen y las de corteza. En estas últimas aparece un pico en 861 que podría deberse a trímeros de estructuras flavonoides como fisetinidina unida a prorobinetinidina y quercetina (274+290+301) (Pasch *et al.*, 2001, Figura 3.4-6A, B y E), los picos sucesivos tuvieron un incremento de 16 Da (861-877, 893-909) originado probablemente por las diferenciadas combinaciones de flavonoles hidroxilados (Hoong *et al.*, 2010).



**Figura 3.4-3.** Zona del espectro de masa donde se observan diferencias entre los valores de  $m/z$  de las muestras de corteza con respecto a duramen. De arriba hacia abajo: CI6Et, CI2Me, CM2Me y DI6Et.

A partir del valor  $m/z$  921 Da, en el espectro obtenido para la muestra de duramen, se determinó una estructura típica polímeros, en este caso probablemente se relacione con la presencia de taninos condensados. Consta de la repetición de un conjunto de picos con formas similares (Figura 3.4-4A; Navarrete *et al.*, 2010). El valor  $m/z$  921 puede atribuirse a un trímero formado por una unidad de catequina (290 Da) unida a dos unidades galocatequina (306 Da) más dos residuos de glucosa (Figura 3.4-6C y D; Bi Athomo *et al.*, 2018). Cada conjunto está formado por cuatro subconjuntos que se repitieron constantemente hasta el valor  $m/z$  1762. La diferencia entre repeticiones sucesivas fue 44 Da (Figura 3.4-4B) y podría adjudicarse a la adición de un residuo galoil que durante el proceso de extracción, perdió el anillo fenólico, es decir solamente el grupo ácido (tanino complejo).

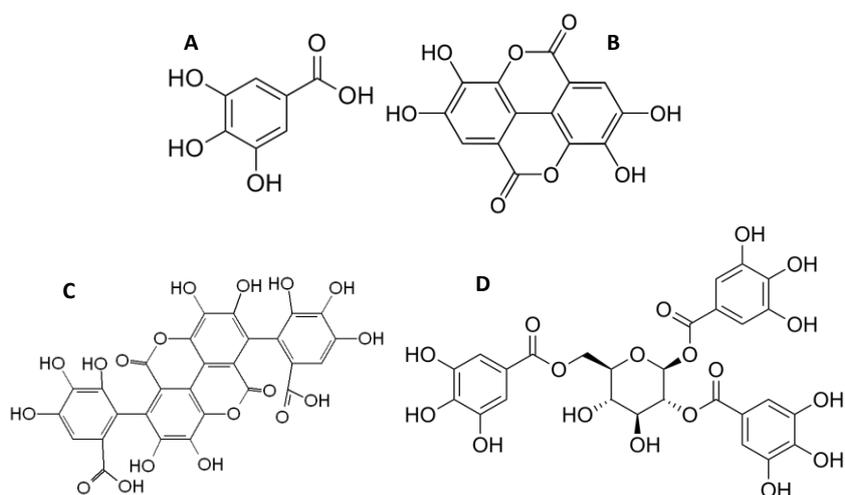


**Figura 3.4-4** Fracción del espectro de masa de la muestra DI6Et A) Estructura típica de polímero observada en espectro de muestra obtenida a partir de duramen. B) Misma estructura ampliada donde se indican las estructuras repetidas (línea negra 44Da).

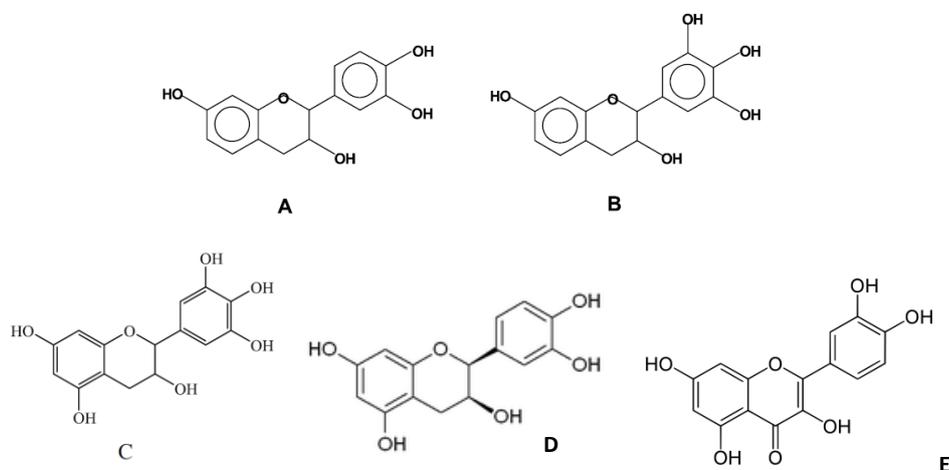
En ninguna de las muestras parecerían existir taninos con grados de polimerización mayores a este: el mayor valor de  $m/z$  obtenido en el espectro de corteza fue 1860, que podría ser adjudicado a un hexámero de catequina; en el de duramen este valor fue 1762, heptámero formado por la condensación de una catequina con 3 galocatequinas más otro monómero de 264 Da (Figura 3.4-6; Navarrete *et al.*, 2010). Estos picos adjudicados a taninos condensados podrían corresponder tanto a estructuras lineales o ramificadas con enlaces del tipo C4–C6 o C4–C8 entre unidades (Hoong *et al.*, 2010).

Las cuatro muestras analizadas poseen compuestos del tipo taninos condensados e hidrolizables que no dependen del método de extracción sino de la muestra de la que se originaron, ya que los extractos provenientes de corteza tienen espectros casi idénticos y diferentes al duramen. En las zonas donde se adjudicaron picos a taninos hidrolizables no existieron diferencias significativas entre las cuatro muestras, la mayor diferencia es a nivel de taninos condensados (monómeros hidroxilados y grados de polimerización). Esto puede explicar el hecho de que solamente DI6Et presentó actividad contra

*L.sulphureus*, reafirmando la hipótesis de que la actividad antimicrobiana no depende únicamente de la concentración. Por otro lado, si bien los espectros de corteza son similares entre sí no se puede afirmar que la estructura de los compuestos sea exactamente la misma: primero porque el mismo valor  $m/z$  puede corresponder a estructuras diferentes y segundo porque los efectos antimicrobianos de las tres muestras fueron diferentes. Para poder llegar a conclusiones más certeras sería necesario determinar la estructura de los compuestos presentes en cada extracto separándolos por cromatografía HPLC, GC y luego un análisis por C-NMR y H-NMR. Estas técnicas son muy utilizadas en estudios de dilucidación de compuestos de madera (Bianchi *et al.*, 2015; Navarrete *et al.*, 2010; Konai *et al.*, 2017).



**Figura 3.4-5 Estructuras de taninos hidrolizables que podrían estar presentes en las muestras.** A) ácido gálico (170 Da). B) ácido elágico (304 Da) C) HHDP-glucósido (638 Da). D) tri-galoil glucosa (656 Da).



**Figura 3.4-6. Estructuras de los monómeros que podrían estar condensados en las muestras.** A) Fisetidina (274 Da) B) Probinetidinina (290 Da) C) Galocatequina (306). D) Catequina (290). E) quercetina (301 Da)

# Capítulo 4

## Conclusiones y perspectivas

---

En este trabajo nos propusimos analizar compuestos naturales con potencial antimicrobiano, provenientes de plantas presentes en nuestro país y poco estudiadas, que puedan ser la base para generar productos ambientalmente amigables.

#### 4.1 Defensinas

La estrategia para aislar nuevas defensinas fue el análisis de los transcriptomas de semillas germinadas de dos especies nativas con usos en la medicina popular *Maytenus ilicifolia* (congorosa) y *Peltophorum dubium* (ibirapitá). En el transcriptoma de congorosa se identificaron 10 secuencias tipo defensinas y en el de ibirapitá ocho. La mitad de ellas fueron clonadas por PCR a partir de ADN genómico y sus secuencias se verificaron (100%). Estos resultados aportan a la validación del ensamble de los transcriptomas y se incluyen en el trabajo “Searching for new antimicrobial peptides in ibirapitá and congorosa transcriptomes” (Rodríguez Decuadro S, Smircich P, da Rosa G, Benko-Iseppon AM, Cacheta G, manuscrito en preparación).

De las nueve secuencias verificadas se corroboraron los genes completos de siete. La estructura génica es similar a los reportados para defensinas con dos exones y un intrón de longitud variable que interrumpe la secuencia que codifica el péptido señal. El péptido deducido es típico de defensinas “verdaderas” con un péptido señal de secreción y un péptido maduro con ocho cisteínas en posiciones conservadas y los motivos CS $\alpha\beta$  y  $\gamma$ -core.

En congorosa además, se encontraron dos *contigs* con los motivos CS $\alpha\beta$  y  $\gamma$ -core que se diferencian por tener dos cisteínas adicionales. Las Cys extra se encuentran en posiciones diferentes a las de PhD1, única defensina de 10 Cys cristalizada hasta la fecha donde todas las Cys intervienen para formar cinco SS. El modelado por homología del péptido maduro MiDN27898 predijo características estructurales típicas con una hélice  $\alpha$  y tres láminas  $\beta$  antiparalelas, en el que las Cys extra no forman enlace. En el caso de MiDN56385, las estructuras reportadas no tienen suficiente homología para generar un modelo confiable con el programa utilizado. De ser verificados estos péptidos, serían candidatos interesantes para realizar la caracterización funcional que permita profundizar en los mecanismos de acción y la influencia de las Cys extra. En el caso de

MiDN56385 se podría realizar un modelado *ab initio* para determinar la relación de dichas Cys con la estructura tridimensional.

Estas secuencias “no típicas” confirman la hipótesis de que congrosa puede ser fuente de AMPs más novedosos que ibirapitá, motivo por el que fue elegida para su estudio. A diferencia de ibirapitá, para cuya familia (Fabaceae) existen datos reportados de genomas y trabajos de caracterización de AMPs, para la familia a la que pertenece congrosa (Celastraceae) no existen estudios de este tipo.

Se caracterizó el péptido MiDf6 de congrosa cuyo modelo estructural es típico de defensinas con hélice  $\alpha$ , láminas  $\beta$  y cuatro enlaces disulfuro. Los mejores resultados en los sistemas analizados *E. coli*/plásmido (*Shuffle* y *Rosetta-gami*/ pET32c y pET102D) se obtuvieron en cultivos a 28°C durante 24hs con cepas *Rosetta Gami* transformadas con ambos vectores; los rendimientos fueron 11  $\mu\text{g/g}$  y 88  $\mu\text{g/g}$  de células con pET32c y pET102D respectivamente.

El proceso de solubilización de cuerpos de inclusión y renaturalización de las proteínas permitió obtener proteínas biológicamente activas. Tanto la proteína MiDf6p32 como MiDf6-Histag inhiben el desarrollo de *A.niger* con valores de MIC de 0.04 y 0.35  $\mu\text{M}$  respectivamente. Estos valores son comparables a los obtenidos en trabajos previos con defensina de ceibo y a los reportados en bibliografía. La actividad contra *A.niger* incluye a MiDf6 en la lista de candidatos (junto a EcDf1 y PDSN1) para ser utilizado como molécula radiomarcada en proyectos en curso, enfocados al diagnóstico de infecciones humanas producidas por estos patógenos, en colaboración con la cátedra de Radioquímica de Facultad de Química.

Las proteínas de fusión sin purificar en ambas construcciones (ensayos de *screening*) fueron también activas contra *B. cinerea* y *P. citricarpa*; la mayor inhibición del crecimiento se observó cuando la defensina está en el extremo C-terminal. Estos resultados y el valor de MIC 10 veces menor cuando la construcción es *histag::trx::midf6* indican la influencia de la posición del péptido en la construcción. Queda para futuros estudios analizar la actividad del péptido sin etiqueta de histidina, para determinar si amerita realizar el clivado de la misma. La construcción en pET32c interesa

particularmente porque, además de obtenerse una proteína con mayor actividad y permitir una mejor visibilidad en ensayos de *screening*, en este sistema la defensina se obtiene con un único corte, lo que minimiza manipulaciones que pueden afectar el producto final. Para aumentar rendimientos se podría probar nuevas cepas de *E.coli*, o realizar una optimización en el uso de codones.

Como otro aporte de esta Tesis, hoy contamos con nuevas secuencias tipo defensina de ambas plantas, varias clonadas, para el análisis de su actividad. A estas secuencias se suman las de otros AMPs identificadas por nuestro grupo en los mismos transcriptomas que incluyen esnaquinas y proteínas de transferencia de lípidos. El ensayo en medio líquido (cultivo sonicado) es un método preliminar para seleccionar péptidos novedosos contra hongos filamentosos previo a la producción. Queda por delante aumentar el rango de hongos ensayados e intentar poner a punto este método para bacterias y levaduras.

Por último, se ha observado para algunos AMPs incluyendo defensinas, que la actividad se conserva cuando se utilizan algunas porciones del péptido maduro. En un estudio con defensinas de alfalfa, por ejemplo, se detectó actividad contra hongos y bacterias cuando se utilizaron péptidos sintéticos con la secuencia correspondiente únicamente al motivo  $\gamma$ -core (Sathoff et al., 2019). Una herramienta utilizada para detectar, a partir de la información de la secuencia del péptido maduro, las porciones relacionadas con la actividad es el programa AMPA (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa>, Torrent et al., 2012). Permite además comparar entre moléculas y por lo tanto podría ser de utilidad como complemento de los ensayos de *screening* para la selección de péptidos que se quieran caracterizar por expresión heteróloga en el futuro. El programa se utilizó para comparar los péptidos MiDf6 y EcgDf1 ambos con actividad probada contra *A. niger*. En ambos casos la región  $\gamma$ -core fue la de mayor probabilidad de ser la responsable de la actividad y en MiDf6 también se detectó una región que abarca mayoritariamente el loop 1. Sería interesante realizar ensayos de MIC con estas porciones de péptidos para comparar actividades y proponer posibles mecanismos de acción.

## 4.2 Compuestos fenólicos

Con el objetivo de seleccionar mezclas ricas en compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana *in vitro* contra hongos xilófagos se utilizó la madera y corteza de *G.triachantos*. Se analizaron varias condiciones de extracción que permitieron determinar las más adecuadas en función del objetivo planteado. Se obtuvieron 30 extractos a partir de los cuales se seleccionaron cuatro, luego de sucesivas etapas.

En los extractos obtenidos a partir de corteza y duramen se cuantificaron taninos hidrolizables, condensados, fenoles totales y flavonoides y se observó actividad contra por lo menos uno de los hongos ensayados. Las muestras de albura no presentaron cantidades significativas de compuestos fenólicos ni actividad antimicrobiana. Los resultados indican que las condiciones de extracción son adecuadas para obtener mezclas con efectos antimicrobianos y que la actividad depende de la presencia de compuestos fenólicos en los extractos. Las muestras acuosas tuvieron menores rendimientos y menores efectos antimicrobianos por lo que no serían las más adecuadas en función del objetivo planteado. Probablemente porque en las condiciones del ensayo los compuestos fenólicos se descomponen y/o porque no se extraen completamente los compuestos relacionados con la actividad.

La actividad antimicrobiana no está relacionada con la concentración de los compuestos analizado en los extractos, las muestras con mayores concentraciones no fueron las más activas, indicando que dicha actividad estaría relacionada al tipo de compuesto presente (estructura química) y efectos sinérgicos entre ellos. Los datos obtenidos por espectroscopia de masa permitieron verificar esta hipótesis. Para complementar y profundizar en este análisis se deberían identificar a nivel estructural los compuestos en cada extracto, para ello se podría realizar una separación por métodos cromatográficos HPLC o GC y una vez que hayan sido aislados y purificados realizar una identificación por RMN.

Los valores de MIC obtenidos para los ocho extractos seleccionados en la primera etapa estuvieron entre 10 a 1.25 g/ml dependiendo del hongo y del extracto y son comparables a los obtenidos para el fungicida Benomil (1.5 - 3 mg/ml).

El fraccionamiento con dietil éter no sería recomendable como parte del proceso ya que luego de dicho procedimiento, en ninguno de los extractos se observó actividad contra *L. sulphureus* y en la mitad de ellos el valor de MIC contra los demás hongos disminuyó. Este proceso insume tiempo, costos, y toma de medidas de seguridad durante la exposición y manipulación, además es comprobado su efecto ecotóxico en peces cuando las concentraciones son altas (2840 mg/l, hoja de bioseguridad). Si bien este compuesto no es altamente contaminante, como en este trabajo se buscan productos ambientalmente amigables es preferible reducir la cantidad de solventes orgánicos utilizados para obtener los extractos.

Las diferencias no significativas en las concentraciones de compuestos fenólicos (excepto en flavonoides que disminuyeron en todos) antes y después del fraccionamiento indican que en los extractos existen otros compuestos (no fenólicos) que son importantes para que exista una acción antimicrobiana y que no se cuantificaron en este trabajo.

La mayoría de los extractos seleccionados provienen de muestras extraídas por infusión en etanol y el tiempo de extracción no parece influir en la actividad antimicrobiana, ya que no se observaron diferencias importantes entre extractos obtenidos durante 2 y 6 horas. Tiempos más largos favorecen la evaporación de los solventes, haciendo más laboriosa la extracción. El etanol además de haber sido más efectivo es más amigable con el ambiente y con la salud de los operarios que el metanol. Dado que los valores de MIC contra los cuatro hongos son similares en muestras de corteza y duramen, previo al fraccionamiento, se puede tener en cuenta que la corteza es más fácil de separar y obtener del árbol que el duramen. En conclusión el método de extracción más conveniente para obtener extractos con actividad antimicrobiana *in vitro* contra los cuatro hongos xilófagos ensayados sería infusión de corteza en etanol durante 2 horas.

Es fungistático y no fungicida en las concentraciones analizadas, por lo tanto los extractos podrían ser utilizados como una primera barrera para la prevención de la degradación de la madera pero deben ser complementados con otros productos o ser aplicados regularmente. En este caso, sería interesante realizar un ensayo que permita determinar el tiempo máximo del efecto fungistático.

Por último, debido a que los factores tanto bióticos como abióticos influyen en la composición y contenido de metabolitos secundarios en las plantas, sería recomendable repetir los ensayos con muestras provenientes de otros árboles de la especie teniendo en cuenta variables como edad, suelo, clima, etc.

Queda para futuros estudios realizar ensayos de impregnación de madera y de actividad antimicrobiana en campo para determinar si la mezcla puede ser utilizada como base para el desarrollo de productos preservantes de madera ambientalmente amigables. También analizar la actividad antimicrobiana sobre un mayor número de organismos ya que un mismo extracto tiene valores de MIC diferentes para cada uno de los hongos analizados. Esto probablemente se deba a que los mecanismos de acción son distintos y deben ser estudiados en profundidad.

# Capítulo 5

## Materiales y métodos

---

## M.1 Cepas, primers y plásmidos

### Hongos

- *Candida albicans* CCMG13
- *Aspergillus niger* CCMG17
- *Botrytis cinerea* CCMG14
- *Phyllosticta citricarpa* LBM22 (cepa aislada de plantaciones de naranjos, Uruguay)
- *Phanerochaete chrysosporium*: DZM1556
- *Punctularia atropurpurascens*: H2126
- *Laetiporus sulfureus* X2345
- *Gloephyllum trabeum* X3546

### Bacterias

- *Escherichia coli* genotipo DH5 $\alpha$ -E dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1
- *Escherichia coli* genotipo TOP10 [F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG]
- *Escherichia coli* genotipo Shuffle (DE3) [F- lac, pro, lacI<sup>q</sup> /  $\Delta$ (ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1  $\Delta$ (phoA)PvuII phoR ahpC\* galE (or U) galK  $\lambda$ att::pNEB3-r1-cDsbC(Spec<sup>R</sup>, lacI<sup>q</sup>)  $\Delta$ trxB rpsL150(Str<sup>R</sup>)  $\Delta$ gor  $\Delta$ (malF)3]
- *Escherichia coli* genotipo Rosetta gami (DE3) [ $\Delta$ (ara-leu)7697  $\Delta$ lacX74  $\Delta$ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL(DE3) F'[lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro] gor522::Tn10 trxB pRARE2 (Cam<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)]
- *Staphylococcus aureus* ATCC6538P
- *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* MAI1008

Tabla M.1. Cepas transformadas

Nombre	Genotipo	plásmido	Origen
T10p102Midf6c1	<i>E. coli Top10</i>	pET102DMidf6	Esta tesis
Rgp102Midf6c3	<i>E.coli Rosetta gami</i>	pET102DMidf6	Esta tesis
Shp102Midf6c1	<i>E.coli Shuffle</i>	pET102DMidf6	Esta tesis
Rgp102Trxc2	<i>E.coli Rosetta gami</i>	pET102DTrx	Rodriguez Decuadro <i>et al.</i> ,2018
Shp102Trxc1	<i>E.coli Shuffle</i>	pET102DTrx	Esta tesis
Rgp32GFPC1	<i>E.coli Rosetta gami</i>	P32GFP	Esta tesis
DH5αp32GFPC3	<i>E coli DH5α</i>	p32GFP	Esta tesis
DH5αp32Midf6c9	<i>E coli DH5α</i>	p32Midf6	Esta tesis
Rgp32Midf6c2	<i>E.coli Rosetta gami</i>	p32Midf6	Esta tesis
Shp32Midf6c2	<i>E.coli Shuffle</i>	p32Midf6	Esta tesis
T10pGPdDf24034c3	<i>E. coli Top10</i>	pGPdDf24034	Esta tesis
T10pGPdDf24034c18	<i>E. coli Top10</i>	pGPdDf24034_18	Esta tesis
T10pGPdDf64469c1	<i>E. coli Top10</i>	pGPdDf64469	Esta tesis
T10pGPdDf60561c3	<i>E. coli Top10</i>	pGPdDf60561	Esta tesis
T10pGPdDf87376c2	<i>E. coli Top10</i>	pGPdDf8737	Esta tesis
T10pGPdDf37676c2	<i>E. coli Top10</i>	pGPdDf37676c2	Esta tesis
T10pGMiDf37676c1	<i>E. coli Top10</i>	pGPdDf37676c1	Esta tesis
T10pGMiDf6861c4	<i>E. coli Top10</i>	pGPdDf6861	Esta tesis

Tabla M.2. Plásmidos

Nombre	Tamaño	Descripción	Origen
pGemTeasy	3015	Vector T	Promega
p102Trx	6327	pET102D:trx::40aminoácidos::histag	Rodriguez Decuadro <i>et al.</i> , 2018
p32GFP	6571	pET32:Histag::trx::GFP	Correa <i>et al.</i> , 2014
pGPdDf24034	3698	pGemTeasy:pddf24034	Esta tesis
pGPdDf24034_18	3698	pGemTeasy:pddf24034_18	Esta tesis
pGPdDf64469	3413	pGemTeasy:pddf64469	Esta tesis
pGPdDf60561	3482	pGemTeasy:pddf60561	Esta tesis
pGPdDf8737	3503	pGemTeasy:pddf8737	Esta tesis
pGPdDf37676_2	3500	pGemTeasy:pddf37676_2	Esta tesis
PGMiDf37676_1	3483	pGemTeasy:pddf37676_1	Esta tesis
pGMiDf6861	3582	pGemTeasy:midf6	Esta tesis
p32Midf6	6230	pET32:midf6	Esta tesis
p102Midf6	6641	pET102:midf6	Esta tesis

Tabla M.3. *Primers*. Se subraya en *primers* utilizados para clonar péptidos en vectores de expresión las zonas correspondientes al vector

Nombre	Secuencia 5'-3'	Función	Ref Biblio
MiDf37676_cR3	CCGAGAGGAAGAACATTAATTC	Clonado congorosa	Esta tesis
MiDf37676_F2	CTCTATATATCAGCAGCTCATTGTC		
MiDf6861_cR2	CAGGACCTCTTAACCGCCTA	Clonado congorosa	Esta tesis
MiDf6861_cF1	GCCATCAACAGTATTCTTAATCCTC		
MiDf33432_cF1	CGTAAGAGAAAAACATGGCAGC	Clonado congorosa	Esta tesis
MiDf33432_cR2	GTGTTGAGGATGACATATGATG		
MiDf27898_cF1	GGTATAATGGCTTACGTTCTACGTG	Clonado congorosa	Esta tesis
MiDf27898_cR1	CTCACATACATCAGGTCA		
MiDf56385_cF1	GGTCACAAGCATCAACAACATG	Clonado congorosa	Esta tesis
MiDf56385_cR1	TTCATCAAAGGATAGCCTCATCAC		
PdDf24034_cR1	CCACAGTACAAAGGACACTTATTC	Clonado ibirapitá	Esta tesis
PdDf24034_cF3	ATCGATCGGAGCACAAAC		
Pd60561_cF3	CGCTTGCATCTTGAAACG	Clonado ibirapitá	Esta tesis
Pd60561_cR3	ATGTGGACCCCACTCGATC		
Pd18833_cF2	TCACTGATCTGTCCGTACCAC	Clonado ibirapitá	Esta tesis
Pd18833_cR1	TCTTCCCTGACTCAGAACCA		
PdDf18833_CF5	AGGACATGCGAGTCTCAGAG		
PdDf18833_cR2	CTGCAGCAAGCACTGTTGA		
Pd64469_cF1	AGATAGGAGGTGGTATAGACATCG	Clonado ibirapitá	Esta tesis
Pd64469_cR2	CTCTGTAGGGGTGGCGAG		
PdDf14712_cF1	GAAGCGAAGACTTGTGAGGTG	Clonado ibirapitá	Esta tesis
PdDf14712_cR6	CTGCTGGTGCACCAAGAACT		
Pd11865_cF1	CTTCCCTGGGCATAAACACTG	Clonado ibirapitá	Esta tesis
Pd11865_cR2	TGATGATACGAGGAGTTGTATGC		
Pd8737_cF1	TGCTCATAATTGAACCTCAATTC	Clonado ibirapitá	Esta tesis
Pd8737_cR2	ACTGCTTTTATTTGGGCTCTG		
pCR21_ampR1	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAG	Verificación pGemTeasy	Barraco Vega <i>et al.</i> , 2017
pCR21_ampR1	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAG		
pCR21_seqF1	GGATAACAATTTACACAGG	Secuenciación de insertos pGemTeasy	Barraco Vega <i>et al.</i> , 2017
pCR21_seqR1	GCGGATTAAGTTGGGTAAC		
pET32amp_1F	GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAG	Verificación insertos pET32c	Esta tesis
pET32amp_1R	AGGTGACGCCAAGATCC		
pET32_seqF1	CACTATAGGGGAATTGTGAGC	Secuenciación de insertos pET32c	Esta tesis
pET102amp_F	ACCAAAGTGGGTGCACTGTC	Verificación insertos pET102D	Esta tesis
pET102amp_R	CACCGCTGAGCAATAACTAGC		
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Secuenciación de insertos pET102D	Universal
MiDf6/102_F	<u>CGGTGATGACGATGACAAGTCCAGGGTTTGTGCGTCGAG</u>	Clonado MiDf6 en vector pET102D	Esta tesis
MiDf6/102_R	<u>TCAATGGTGATGGTGATGATGCCTTCCCTCGATACAAAGCTTAG</u> TGCAGAAGCAG		
MiDf6/32_F	<u>AAACCTGTATTTTCAGGGATCCAGGGTTTGTGCGTCGAG</u>	Clonado MiDf6 en vector pET32c	Esta tesis
MiDf6/32_R	<u>CAGCTGCCGGATCCTTAACAAGCTTAGTGAGAAGCAG</u>		
MiDf4/32_F	<u>AAACCTGTATTTTCAGGGATCCAGGGTTTGTGTCACCGAG</u>	Clonado MiDf4 (MiDN37676) en vector pET32c	Esta tesis
MiDf4/32_R	<u>CAGCTGCCGGATCCTTAACAGCGCTTAGAGCAAACACA</u>		
PdDf8/32_F	<u>AAACCTGTATTTTCAGGGATCCAGGGTGTGCGAATCACAGAG</u>	Clonado PdDf8 en vector pET32c	Esta tesis
PdDf8/32_R	<u>CAGCTGCCGGATCCTTAGCAAAGCCGAGTGACAGAA</u>		
PdDf24/32_F	<u>AAACCTGTATTTTCAGGGATCCAAAATATGCGGGAGGATGAG</u> C	Clonado PdDf24 en vector pET32c	Esta tesis
PdDf24/32_R	<u>CAGCTGCCGGATCCTTAACAGTTGAAGTAGCAGAAGCAAGC</u>		

## M.2 Medios de cultivo

Para cultivos sólidos a los medios se les agrega 1.5 % de agar.

Esterilización por calor húmedo: 15 minutos a 121°C.

### Hongos

Medio Potato dextrosa Broth (PDB): 24 g de medio en 1L de agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo.

### Bacterias

#### *Escherichia coli*

- Medio Luria-Bertani (LB): 10 g bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl. Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 7. Se esteriliza mediante calor húmedo.
- Medio Luria-Bertani (LB) para células competentes: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl. Se lleva a 950 ml con agua destilada, se ajusta el pH a 7 y se completa hasta 1 L con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo.

Ampicilina: 100ug/ml. Stock= 100 mg/ml.

Para seleccionar (por placa): 40 µL X-gal (2%) y 4 µL de IPTG (20%).

- Medio SOB: 20 g de bacto- triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl. Se lleva 950 ml con agua destilada, se ajusta el pH a 7 y se completa hasta 1 L con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo.
- Medio SOC: A 10 ml de SOB esterilizado y enfriado a menos de 60°C se le agregan 50 µL de MgCl<sub>2</sub> 2M y 200 µL glucosa 1M.
- Medio autoinductor ZYM 5052 (Studier, 2005): 10g triptona, 5g extracto de levadura, 0.15g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 7.1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.3g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 1L de agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo y se agrega 1mL solución oligoelementos y 40ml solución azúcares.

Solución azúcares: 5g lactosa, 1.25g glucosa, 12.5g glicerol en 100ml agua destilada.

Filtrar con filtro de 22 µm.

### Solución oligoelementos:

FeCl <sub>3</sub>	5mL (Cf 50mM)
CaCl <sub>2</sub>	22mg (cf 20mM)
MnCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	20mg (cf 10mM)
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	18mg (cf 10mM)
CoCl <sub>2</sub>	2.6mg (cf 2mM)
CuCl <sub>2</sub>	2.7mg (cf 2mM)
NiCl <sub>2</sub>	2.6mg (cf 2mM)
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	3.5mg (cf 2mM)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.2mg (cf 2mM)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	4.1mg (cf 2mM)
H <sub>2</sub> O destilada	Hasta 10 ml

### Otras bacterias

Medio Tryptic soy broth (TSB): 30g del medio en 1L de agua destilada, se esteriliza por calor húmedo.

## M.3. Métodos

### M 3.1 Análisis de contigs obtenidos por ARNseq (Rodríguez Dcuadro, 2018).

La biblioteca de ADNc obtenida del pool de ARNm se secuenció usando la plataforma Illumina HiSeq2000 en *paired-end* de 100pb por corrida. Las lecturas de buena calidad se ensamblaron con Trinity (Grabherr et al. 2011) y este ensamblado se evaluó y filtró con la herramienta Transrate (Smith-Unna et al 2016), estimando la calidad de contigs individuales.

Por tratarse de especies nativas, los genomas de las plantas analizadas no están secuenciados. Se usaron en el caso de *P. dubium* dos genomas: el de *Medicago truncatula* y el de *Glycine max*, dos especies de la misma familia. En el caso de *M. ilicifolis*, no existen genomas secuenciados de especies de la misma familia, se realizó un ensamblado de novo. Se utilizó una lista de motivos que de acuerdo con la disposición de los residuos cisteína (Slavokhotova et al. 2015), para crear un script de búsqueda.

Los transcritos donde se observó uno o más motivos cisteína se cortearon contra las bases de datos SwissProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed:yes>) y TrEMBL (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed:no>) con valor esperado máximo (e-value 10e<sup>-5</sup>) de 10e-05.

Los criterios para la selección final de un transcripto como defensiva-like fueron los siguientes: a) cuando el ORF que incluye el motivo cisteína no es el más largo y/o tienen anotación en otro marco de lectura se descartaron; b) cuando el ORF con el motivo cisteína es el más largo pero tiene anotación que no corresponde con defensas se descartan; c) de los transcriptos sin anotación se tuvieron en cuenta sólo aquellos donde el ORF con el motivo cisteína fue el más largo. No se descartaron los transcriptos con ORF incompletos (desde Metionina inicial hasta el codón stop), si contenían el motivo cisteína completo.

### **M 3.1 Técnicas empleadas con ADN**

#### **M3.1.1 Extracción de ADNg de planta**

La extracción de ADNg de muestras vegetales se realizó según Doyle (1991) con modificaciones. Una muestra de 0.5-1.0g de tejido fresco de hojas se pulveriza en mortero estéril con nitrógeno líquido. El polvo se trasvasa a eppendorf se agrega 1 ml/0.2g de buffer CTAB, se mezcla suavemente y se incuba durante 30 minutos en agitación a 65°C. Se centrifuga 10 minutos a 12000rpm y se recupera el sobrenadante que se extrae con un volumen de solución cloroformo isoamílico (24:1). Se centrifuga 2 minutos a 10000rpm a 4°C y se precipita con 2/3 de volumen de isopropanol frío. Se repite centrifugación y el pellet se lava con 500 µL de EtOH 70% frío y se centrifuga una vez más. El pellet se deja secar y se resuspende en 385 µL de TE 1X, se agregan 15 µL de ARNasa (10µg/ µL) y se incuba 30 minutos a 37°C. Posteriormente se agregan 20 µL de NaCl 4M y se precipita con 2 volúmenes de EtOH abs 1 hora a -20°C. Se centrifuga 20 minutos a 10000g a 4°C. El pellet se lava con 500 µL EtOH 70% frío y se centrifuga 10 minutos a 10000rpm a 4°C. El pellet se seca y se resuspende en 50 µL en agua mQ.

Buffer CTAB: 2% CTAB (Sigma Aldrich), 1.4 M NaCl, 0.2% B-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0.

#### **M3.1.2 Amplificación por PCR convencional**

Las verificaciones de los *contigs* obtenidos en ensamble de transcriptoma y de los clones obtenidos se realizan por PCR convencional con la enzima Taq Polimerasa

(Invitrogen, 5U/  $\mu$ L) en un volumen final de 25  $\mu$ L con: 2,5  $\mu$ L de buffer de Taq Pol, 1  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 2,5  $\mu$ L de dNTPs (10 mM) (Promega), 1,5  $\mu$ L de cada primer (10  $\mu$ M), 0,25  $\mu$ L de Taq Pol y 10-100 ng de ADN. Se utiliza un programa de (termociclador Corbett (CG1-96)): 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de *annealing* correspondiente y 2-5 minutos a 72°C y por último 5 minutos a 72°C.

### **M3.1.3 Clonado en vector T.**

Los productos de PCR se corren en un gel de agarosa para escindir las bandas y purificarlas mediante minicolumnas Wisard (Promega). Las bandas se cortan en trozos y se introducen en las columnas, se centrifuga a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se realiza la precipitación con 1/10 de volumen de NaAc y 2 volúmenes de EtOH absoluto durante toda la noche a -20°C. Luego se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 13000 rpm, se lava con 1 ml EtOH 70 y se vuelve a centrifugar 15 minutos a 4°C a 13000 rpm. El pellet se seca y se resuspende en 10-20  $\mu$ L de agua mQ. El clonado en el vector pGemTeasy (Promega) se lleva a cabo según las recomendaciones del fabricante. Los productos de ligación se precipitan con ARN-t y se transforman células Top10 de *E. coli*. mediante electroporación.

### **M3.1.4 Precipitación de los productos de ligación con ARN-t (Zhu y Dean, 1999).**

La mezcla de precipitación se realiza con 5  $\mu$ L del producto de ligación, 5  $\mu$ L de ARN-t (0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L) (Invitrogen), 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ y 50  $\mu$ L de EtOH absoluto. Se centrifuga a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet se lava con 100  $\mu$ L de EtOH 70% y se centrifuga a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se deja secar y se resuspende en 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ.

### **M3.1.5 Transformación de células de *E. coli* mediante electroporación**

Para llevar a cabo un proceso de transformación mediante electroporación (equipo MicroPulser TM *BIO-RAD*) en primer lugar se descongelan células competentes en hielo y se agrega a 2  $\mu$ L de vector con secuencia de interés. Se transfiere la mezcla a la celda (0,2 cm), se electropora (modo Ec2) y se agrega 1 ml SOC. Los parámetros de pulso deben ser de aproximadamente 5 milisegundos y entre 2,5 y 3 KV. La mezcla de transformación se incuba con agitación durante 1 hora a 37°C. Se plaquea 1/10 del

producto de transformación en placas de LB ampicilina con X-gal e IPTG y se incuba a 37°C no más de 20 horas.

### **M3.1.6 Subclonado *pET102D* por Restriction-Free cloning PCR (van den Ent y Löwe, 2006)**

#### M3.1.6.a Primera PCR (producción de “megaprimer”)

La PCR se realiza en un volumen final de 50 µL con 10 µL de buffer de enzima (5X), 0,5 µL de Taq polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific 2U/µL) 5,0 µL de dNTPs (10 mM) (Promega), 2,5 µL de cada primer (10µM) y 50ng de ADN plasmídico pGEM-Teasy que contiene las secuencia de interés. La reacción se lleva a cabo utilizando un programa de: 45 segundos a 98°C; 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 56°C, 15 segundos a 72°C y una extensión final de 3 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se verifican por electroforesis en agarosa y los de tamaño esperado se purifican en minicolumnas Wisard (Promega) (ver sección 3). El pellet se resuspende en 10 µL de agua mQ y se cuantifica ADN mediante espectrofotometría (Nanodrop).

#### M3.1.6 .b Clonado en vector de expresión (segunda PCR RF-cloning)

El producto purificado resultante de la primer RF-PCR se utiliza como único primer (*megaprimer*, 100ng) en una segunda reacción de PCR en un volumen final de 50 µL con: 10 µL de buffer de Taq polimerasa (5X), 0,5µL de Taq polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific 2U/µL), 1,0 µL de dNTPs (10 mM) (Promega) y 20 ng de ADN plasmídico pET102D. La reacción se lleva a cabo utilizando un programa de 45 segundos a 98°C y 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 56°C, 6 minutos a 72°C y una extensión final de 3 minutos a 72°C. Se incluyen dos blancos, uno sin *megaprimer* y otro sin plásmido pET-102.

### **M3.1.7 Subclonado en vector de expresión pET32c por *Transfer-PCR* (Erijman et al., 2011)**

La PCR se realiza en un volumen final de 50 µL con 10 µL de buffer de Taq polimerasa (5X), 0,8 µL de Taq polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific 2U/ul) 5 µL de dNTPs (2 mM) (Promega), 1 µL de cada primer (1 µM), y de de ADN plasmídico pGEM-Teasy que contiene la secuencia de interés y 10ng/ul de ADN plasmídico pET32cGFP. La reacción se lleva a cabo utilizando un programa de: 1 minuto a 98°C y dos ciclos

sucesivos, el primero de 13 ciclos de 10 segundos a 98°C, 1 minuto a 56°C y 30 segundos a 72°C, el segundo de 10 segundos a 98°C, 1 minuto a 52°C y 3 minutos a 72°C, una extensión final de 5 minutos a 72°C. Se incluyen dos blancos, uno sin *megaprimer* y otro sin plásmido pET32c.

### **M3.1.8 Digestión con enzima DpnI**

El vector parental es digerido en un volumen final de 20 µL con 1 µL de DpnI (20 U/µL), 2 µL de buffer y 10 µL del producto obtenido en sección 6 y 7 durante 2 horas a 37°C. El volumen total de la digestión se precipita con ARN-t y se transforman mediante electroporación células *E. coli Rosetta gami y Shuffle* según protocolos descritos anteriormente (sección 5). Se realiza ésta misma digestión para el control sin *megaprimer*. Se plaquea todo el producto de las transformaciones en placas de LB ampicilina y se incuba a 37°C no más de 20 horas.

### **M3.1.9 Extracción de ADN plasmídico**

Para realizar la extracción de ADN plasmídico se realizan minipreparaciones partiendo de un cultivo de cada colonia aislada en 3 ml de LB ampicilina incubado toda la noche a 37°C y 150 rpm. Se centrifugan 1,5 ml a 12000 rpm durante 2 minutos y se agregan 200 µL de solución I, 200 µL de solución II y 200 µL de solución III dejándolo 15 minutos en hielo. Se centrifuga durante 10 minutos a 12000 rpm y se recupera el sobrenadante. Posteriormente se agrega 1 volumen de cloroformo: isoamílico (24:1) y se centrifuga durante 6 minutos a 9000 rpm. La precipitación se realiza con 2 volúmenes de EtOH 96 y 1/10 de volumen de NaAc 3M centrifugando durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. El pellet obtenido se resuspende en 30 µL de agua mQ.

Buffer TE: 10 mM Tris-HCl pH7.6 y 1 mM de EDTA pH8. Se esteriliza mediante calor húmedo.

Solución I: 100 µL de ARNasa (10 mg/ml) en 10 ml de TE.

Solución II: 1% SDS y 0,2 M de NaOH. Se prepara en el momento antes de usar.

Solución III: 60 ml de KAc 5M, 11,5 ml de HAc glacial y 28,5 ml de H<sub>2</sub>O. Se esteriliza mediante calor húmedo.

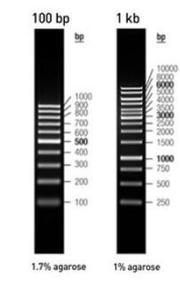
### M3.1.10 Electroforesis de ADN

Para visualizar ADN genómico, plasmídico y productos de amplificación se realiza una electroforesis en gel de agarosa 0,8 % o 2,5% (según tamaño del producto) en buffer TBE 0,5x con 0,2 µL/ml de Goodview™. Las muestras se siembran con ayuda del buffer de carga 5x. La corrida se realiza a 100-150 V durante 20-60 minutos. Como marcador de peso molecular se Utiliza 1 kb DNA Ladder o 100pb DNA Ladder (Thermo Scientific)

Buffer Tris Borato (TBE) (10X): 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 ml de EDTA 0.5M (pH=8) en 1L de agua destilada.

Buffer de carga (5x): 0,25% de azul de bromofenol y 30% de glicerol en agua.

Marcador de peso molecular Plus 100 pb y 1 Kb (Thermo Scientific)



### M3.1.11 Preparación de células electrocompetentes

Para la preparación de las células electrocompetentes de *E. coli* Top10 se realiza un precultivo en 3 ml de LB que se incuba toda la noche a 37°C. Con 1 ml de precultivo se inoculan 250 ml de LB y se incuban a 37°C a 300 rpm donde se dejan crecer las células hasta obtener una DO<sub>600</sub> entre 0,5 y 0,7. Posteriormente se transfiere el cultivo a tubos de centrifuga y se deja en hielo durante 20 minutos. Se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 4000g, se elimina todo el sobrenadante, se resuspende en 1 volumen de glicerol 10% y se centrifuga en las mismas condiciones. Se resuspende en ½ volumen de glicerol 10% y se vuelve a centrifugar. Posteriormente se resuspende en 1/25 volumen de glicerol 10% y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Por último se resuspenden en 1 ml de glicerol 10%. Se guardan 50 µL de las células en eppendorf, se congelan en N<sub>2</sub> liquido y se guardan a -70°C. La evaluación de las células competentes se realiza mediante electroporación con 10 pg del plásmido pUC19, se debe obtener una

eficiencia de transformación igual o mayor de  $10^8$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de vector. electroporado.

## **M3.2 Técnicas empleadas con proteínas**

### **M3.2.1 Producción de proteína recombinante (ensayo piloto)**

Se realiza un precultivo inoculando 3ml de medio LB ampicilina con una colonia aislada de *E. coli* RG/Shuffle transformadas con las construcciones de los vectores de expresión y se incuba toda la noche a  $37^\circ\text{C}$  a 150rpm. Transcurrido este tiempo 500  $\mu\text{L}$  del precultivo se inoculan en 10 mL de LB ampicilina y se incuba a  $37^\circ\text{C}$  150 rpm dejándose crecer hasta obtener una  $\text{DO}_{600}$  entre 0,5 y 0,7. Posteriormente se separa el cultivo en 2 matraces de 5mL c/u y uno de ellos se induce con 5 $\mu\text{L}$  IPTG 800mM (concentración final 1mM). Se remueve una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  de cada uno de los matraces ( $t=0$ ) y luego se incuban a  $20^\circ\text{C}$ ,  $28^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  a 150rpm. Se toman alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  cada 6 horas de cada uno de los matraces y se incuban un máximo de 36hs. Las alícuotas en cada tiempo se centrifugan a 10000rpm por 2 min y el pellet se guarda en heladera a  $-20^\circ\text{C}$ . Luego de transcurrido el tiempo total (36hs) los pellet se descongelan en hielo y se resuspenden en 100  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis, se sonicán 4 veces (Programa recall 2, tiempo 15 segundos, pulso 2.5, AMP1 30%) alternando entre muestras siempre en hielo. Luego se centrifugan a  $4^\circ\text{C}$ , 5 minutos a 10000 rpm para separar el sobrenadante (fase soluble) y pelet (fase insoluble). Al pellet se le realizan 2 lavados más con 100  $\mu\text{L}$  buffer de lisis, se centrifuga 5 min a  $4^\circ\text{C}$  10000 rpm y se junta toda la fase soluble. Ambas fases se guardan a  $-20^\circ\text{C}$  para su posterior visualización en gel de poliacrilamida 15%.

Buffer de lisis: 20 mM Tris-HCl  $\text{pH}=8$ , 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10 % glicerol en agua.

### **M3.2.2 Producción de proteína recombinante**

Se realiza un precultivo de 20 mL de LB ampicilina con una colonia aislada de cepa transformada (seleccionada en función del experimento piloto) con plásmido de expresión de secuencia de interés. Se incuba toda la noche a  $37^\circ\text{C}$  a 150 rpm. Luego se inoculan por duplicado 100 mL LB ampicilina (en matraz 1L), con 10 mL de precultivo y se incuba nuevamente a  $37^\circ\text{C}$  a 150 rpm hasta obtener una  $\text{DO}_{600}$  entre 0,5 y 0,7.

Posteriormente uno de los matraces se induce con 125  $\mu$ L IPTG 800mM (concentración final 1mM) y se incuba a 150 rpm, el tiempo y temperatura óptimo para la producción de la proteína (determinado en ensayo piloto, sección 1). Transcurrido este tiempo, el cultivo se transfiere a tubos de 50 ml (previamente pesados, 2 por cultivo) y se centrifuga 15 minutos a 4°C y 4000g. Se descarta el sobrenadante y el proceso se repite con todo el cultivo. El pellet se pesa y se calcula el peso húmedo de cada cultivo. Se agrega al pellet de a poco y suavemente buffer de lisis (10ml/g de células) en hielo. Una vez resuspendido totalmente el pellet se realiza el sonicado siempre en hielo: 4 rondas programa Recall2: Tiempo 15" pulso 2,5 amp1 30%. Las muestras se centrifugan 10 minutos a 4°C 10000 rpm para separar el pellet de la fase soluble y ambas se guardan a -20°C. Previamente se separan alícuotas de cada fracción (50  $\mu$ L) para visualizar en gel de poliacrilamida 15%.

### **M3.2.3 Tratamiento con tritón**

El pellet obtenido en la sección anterior (previo al sonicado) se resuspende en 4ml de buffer de lisis, se agrega 1mg/ml de Lisosima (Sigma Aldrich), se incuba en hielo durante 30 minutos y luego 10 minutos más a 4°C en agitación. Transcurrido este tiempo se agrega tritón a una concentración final de 1%, RNAasa y DNAasa (Invitrogen) a una concentración final de 5ug/ml cada una y se continúa incubando 10 minutos a 4°C en agitación. Por último se centrifuga durante 30 minutos a 10000g para separar la fase soluble y la insoluble y se guardan a -20°C. Una fracción de cada una se visualiza en gel de poliacrilamida 15%.

### **M3.2.4 Solubilización en urea**

La solubilización se realiza según Tomisawa y colaboradores (2015) con modificaciones. El pellet obtenido en sección 2 se resuspende en 4 ml de buffer de lisis adicionado con 4M de urea. Para lograr una solubilización homogénea se utilizan pipetas p1000, luego p200, jeringa de 10ml y luego de 1ml. Se incuba a 37°C con agitación a 150 rpm toda la noche. Posteriormente se centrifuga durante 30 minutos a 10000g a 4°C para separar la fase soluble de la insoluble, una fracción de cada una se visualiza en gel de poliacrilamida 15%. Se guarda en heladera a 4 °C para su uso posterior.

### M3.2.5 Purificación por cromatografía de afinidad (IMAC-Ni<sup>+2</sup>)

#### M3.2.5 a Preparación de la matriz

En una columna PD-10 vacía se colca la placa de filtración y se marca el volumen (2 ml) con agua destilada. La columna se llena con la matriz comercial *Chelating Sepharose* (General Electric) hasta el volumen marcado, se coloca la segunda placa de filtración y se eluye el buffer de sefarosa. La columna empaquetada se lava con 3 volúmenes de columna (VC) de agua destilada y luego con 3 VC de una solución 0.1M de NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich). Para eliminar el exceso de metales se lava nuevamente con 3 VC de agua destilada y luego se equilibra con 3 VC de buffer de lisis frío.

#### M3.2.5 b Refolding en columna de proteínas solubilizadas y purificación

Las proteínas recombinantes solubilizadas en urea (solución 4M, sección 4) se mezcla con la matriz de níquel y se deja en batch durante 1 hora a 4°C. Transcurrido el tiempo se realiza el cambio de buffer para eliminar la urea suavemente y facilitar el *refolding* de la proteína pegada a la columna. Primero se eluye el percolado y se realizan lavados sucesivos con *binding buffer* en gradiente de urea (3 VC) concentraciones 3M, 2M, 1M, 0.5M y sin urea. Los eluidos se siguen por absorbancia a 280nm hasta DO=0. Una vez realizado el cambio de buffer se realiza la elución con 3-5 VC de binding buffer gradiente de imidazol (10, 20, 30, 50, 100, 150, 250, 300, 400, 500mM) para purificar el péptido recombinante. Las eluciones con buffer de concentraciones menores a 50mM se siguen por absorbancia a 280 nm hasta 0. Las terceras alícuotas de todas las fracciones se visualizan, posteriormente, mediante geles de poliacrilamida 15%.

Binding buffer: 20mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 10% glycerol.

Soluciones de Imidazol: se prepararan por dilución de una solución madre 4M en binding buffer.

Soluciones de Urea: se preparan por dilución de una solución madre 10M en binding buffer

### **M3.2.6 Digestión del péptido recombinante con enteroquinasa (EK) en columna**

Para obtener el péptido purificado sin Tiorredoxina, previo a la elución con buffers mayores a 100mM de imidazol, se realiza la digestión en columna con enteroquinasa (EK, Invitrogen). Como primer paso se agrega a la columna buffer de enzima diluido en agua 1/10 para eliminar el imidazol y se recupera 1,6 mL. Se agrega nuevamente 1 VC de buffer ahora con 7.5  $\mu$ L de enzima (1.0 UE/ $\mu$ L) y se deja en batch 60 hs a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se eluye el percolado y se realizan lavados con un mínimo de 3 VC de buffer 20mM y 30mM de Imidazol para eluir la Enteroquinasa y la Tiorredoxina. Estas eluciones se siguen por absorbancia a 280 nm hasta OD=0. La elución del péptido por competencia con imidazol se realiza con buffer DE 300mM con 3-5 VC. Los resultados de la digestión se visualizan en gel de poliacrilamida 15%.

### **M3.2.7 Eliminación del imidazol por diálisis**

Las alícuotas que tengan las muestras de interés se cargan en una membrana de diálisis de 1000 Da (Spectra/Por Biotech) previamente lavada con agua destilada. La diálisis se realiza contra buffer 100mM, 50mM de Imidazol y agua destilada sucesivamente (dilución 1/100) durante 2 horas a 4°C en agitación magnética. Transcurrida la diálisis el volumen la membrana se pasa a un tubo y se congela de forma inclinada para su posterior liofilización. Las muestra liofilizadas se resuspenden en 200  $\mu$ L de buffer fosfato de potasio 0.1M pH=PI $\pm$ 1 para los análisis de actividad antimicrobiana.

### **M3.2.8 Electroforesis de proteínas**

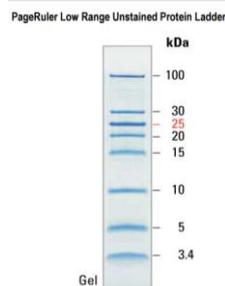
Se preparan geles de acrilamida/bisacrilamida al 15% de 1 mm de espesor. La electroforesis se realiza utilizando el sistema buffer SDS-PAGE propuesto por Laemmli (1970) en buffer tris-tricina (Schagger 2006). Las muestras se siembran con ayuda del buffer de carga 2X. Como referencia se siembran 5  $\mu$ L un marcador de peso molecular (Invitrogen). La electroforesis se realiza a 75 mV durante 30 min y 100 mV durante 1 hora en buffer de corrida. Una vez finalizada se retiran los geles y se dejan durante 20 min en *shaker* con solución de tinte azul de Coomassie. Se realizan sucesivos lavados con gran volumen agua destilada y calentando en microondas máximo 3 minutos cada lavado, hasta decolorar el ruido de fondo.

Buffer de corrida Tris-Tricina (1X): 12,08 g de Tris base, 17.92 g tricina y 5 mL de SDS 20% en 1L de agua destilada.

Buffer de carga (2x): 0,1 % azul bromofenol, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 2% Beta-mercapto-etanol y 10 % glicerol en agua.

Azul de Coomasie (tinción geles de poliacrilamoda): 0.4 g azul coomasie R25 (Sigma Aldrich), 20 mL de ácido acético glacial, 100 mL etanol 96% y 80 mL agua destilada.

Marcador de peso molecular ThermoFisher 100 KDa:



### **M3.2.8 Preparación del gel acrilamida/bisacrilamida 15 % (3 minigeles de 10 x 8 x 0.75, 1, 1.5 cm)**

Se limpian los vidrios con agua jabonosa, se enjuaga bien con agua y luego con etanol 70, se deja secar y se arma el sistema (E5889 SIGMA-Aldrich Vertical Electrophoresis Unit, fixed height, dual gel-mini). Se preparan 30 mL de la mezcla *Resolving*. Se introduce la mezcla entre vidrios cuidando de no formar burbujas y se agregan 400  $\mu$ L isopropanol sobre cada gel. Se deja gelificar hasta observar una línea definida entre gel y el isopropanol y la polimerización en sobrante de mezcla en falcon. Se descarta el isopropanol, se lava con abundante agua en cada uno de los geles y se seca bien con papel de absorbente. Se preparan 10mL de la mezcla *Stacking*, se agregan suavemente en cada gel hasta el borde del vidrio y se colocan los peines. Se deja hasta ver polimerización de sobrante de mezcla en falcon.

Resolving buffer 15%: 10 ml de buffer de gel, 11.3 ml de mix 40% acrilamida/bisacrilamida (29:1) (Amresco), 0.012 ml de TEMED (BioRad), 0,3 ml de solución de persulfato de amonio al 10% (catalizador de polimerización, agregar al final), agua destilada hasta 30ml.

Stacking buffer 5%: 2.5 ml de buffer de gel, 1.24 ml de mix 40% acrilamida/bisacrilamida (29:1) (Amresco), 0.01 ml de TEMED (BioRad), 0.1 ml de solución de persulfato de amonio al 10% (catalizador de polimerización, agregar al final), agua destilada hasta 10ml.

### **M3.2.9 Cuantificación por Bradford**

Previamente, se realiza una curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar. Se preparan soluciones de 0.025, 0.050, 0.075, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , en una placa de 96 pocillos. Se toman de 20  $\mu\text{L}$  de cada uno y se le agregan 180  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford. Se deja durante 10 minutos en oscuridad y se mide la absorbancia a 595 nm. Con los valores obtenidos se realiza la curva de calibración que se ajusta a una función cuadrática de forma  $y = ax + b$ , siendo  $y$  la concentración de BSA en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y  $x$  la absorbancia a 595 nm. Para realizar las medidas de las muestras se realiza el mismo procedimiento y por interpolación se obtiene la concentración. A partir del peso molecular (PM) de cada proteína se calcula la concentración en el volumen de muestra.

Reactivo de Bradford: 30 mg azul coomasie G250, 15 mL etanol absoluto, 30 mL ácido fosfórico y 255 mL agua destilada. Conservar en heladera y alejado de la luz.

### **M3.2.10 Análisis de por MALDI TOF de proteínas (servicio contratado)**

El espectro se obtiene en un equipo 4800 (Abi Sciex) en el modo de adquisición "Linear Mid". Rango  $m/z$  5000-20000 La muestra se desala y concentra por columna en fase reversa en tip (ziptipC4). En el análisis Se utiliza como matriz CHCA 60%ACN/1%TFA y un estándar externo Mix 3 (B20) (Sequazyme Peptide Mass Standards Kit de PerSeptive Biosystems).

## **M3.3 Técnicas empleadas con compuestos fenólicos**

### **Solventes**

Etanol PPA

Metanol PPA

Dietar-éter PPA

### **M3.3.1 Extracciones**

Para la extracción de compuestos fenólicos se utilizó la madera de *Gleditsia triachantos* L, colectada en Cerro Largo en setiembre de 2015. Una porción de la madera fue utilizada para determinar la edad del individuo (55 años) en el Laboratorio Forestal del CUT por dendrocronología y otra porción fue secada al aire durante 48hs. Luego de secada se separó albura, corteza y duramen y se trituró con molino de cuchillas hasta obtener una granulometría de 0,400mm (malla 40) para realizar las extracciones según Naima y colaboradores (2015) con modificaciones.

Las condiciones ensayadas fueron: i) maceración en metanol 80% y etanol 80% a temperatura ambiente ii) infusión en etanol 80% y metanol 80% a 60°C; iii) infusión en agua a 100°C vi) mortereado en agua a 100°C. Todas las extracciones se realizaron durante 2 y 6 horas excepto infusiones en metanol y maceraciones en etanol que se realizaron únicamente durante 2 horas. La relación muestra solvente fue de 1g por cada 20ml, todos los ensayos se realizaron por duplicado y en oscuridad para evitar la degradación de los compuestos por exposición a la luz (Okuda *et al.*, 1989).

#### M3.3.1.a Extracciones con solventes orgánicos

Las muestras se colocan en cristizador junto al solvente (etanol, metanol 80%) y se cubren con aluminio para evitar la descomposición de compuestos fenólicos con la luz y parafilm para evitar evaporación del solvente. Las maceraciones se realizan a temperatura ambiente (20°C) y las infusiones en baño de agua a 60°C. Ambas extracciones se realizan con agitación moderada durante 2 y 6 hora s.

#### M3.3.1.b Extracciones acuosas

Al igual que las extracciones orgánicas las muestras se tapan para prevenir degradación por la luz y evaporación del solvente. El mortereado se realiza inmediatamente después de agregar el agua. Las extracciones se realizan en baño de agua a 100 °C durante 2 y 6 horas con agitación moderada para infusiones y mortereado.

Tanto para solventes orgánicos como acuosos luego de la extracción las muestras se filtran y se realizan las medidas espectrofotométricas correspondientes.

### M3.3.2 Medidas espectrofotométricas.

#### M3.3.2.a Fenoles totales (Scalbert, 1992)

2,5ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10 se agregan a 0,5ml de extracto diluido 1/200. Luego de máximo 8 minutos se agregan dos mililitros de solución de carbonato de sodio 0.7M. Se calienta en baño de agua a 50°C por 5 minutos y se transfiere a agua fría (si es necesario se centrifuga) se ve color azul violáceo. La absorbancia se mide inmediatamente a 760nm. Se realiza una curva de calibración con ácido gálico (8-80ug/ml) y los valores se expresan en mg de equivalentes de ácido gálico por g de madera (mg GAE/g).

Solución madre de ácido gálico: 0.4g de ácido gálico en 100ml de agua destilada

Carbonato de sodio 0.7M: 7,5g en 100ml de agua destilada.

#### M3.3.2.b Taninos condensados

Se realiza una dilución 1/100 del extracto y a 0,5 ml de esta se le agregan 5 ml de solución de ácido ferroso en BuCl. Se cubren los tubos con la mezcla con papel aluminio de la luz y se calientan en baño de agua a 95°C por 15 min. Se mide la absorbancia 530nm. El contenido de taninos condensados se expresa como mg de equivalentes de cianidina por gramo de madera (mg CyaE/g) y se determinó según la fórmula:

$$\text{mg Cya/g} = (A \times V \times D \times M) / (l \times \epsilon \times m \times v_2)$$

donde: A es  $Abs_{530nm}$  de la muestra, V es el volumen de reacción (20mL), D es el factor de dilución (100), M es la masa molar de cianidina (287.24424 g/mol), l es el largo de la celda utilizada (1cm),  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de cianidina (34700 Lmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>),  $v_2$  es el volumen de muestra utilizado en la reacción (0.5mL).

Solución de ácido ferroso: 77mg de FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O en 500ml de HCl/BuOH(2/3).

#### M3.3.2.c Taninos hidrolizables (Bossu et al., 2006)

Se calientan en baño de agua 5ml de una solución de KIO<sub>3</sub> 2,5% durante 7 minutos a 30°C. Inmediatamente después se agrega 1 ml del extracto diluido 1/5 y se calienta durante 2 minutos más. La absorbancia se mide a 550nm. Se realiza una curva de

calibración con ácido tánico (0,1- 1ug/ml) y los resultados se expresan como mg de equivalentes de ácido tánico por gramo de madera (mg TAE/g)

Solución madre de ácido tánico: 0.5g de ácido tánico en 100ml de agua destilada

Solución de KIO-2,5%: 2.5g de KIO en 100ml de agua destilada.

#### M3.3.2.d Flavonoides

A 1mL del extracto se agregan 3mL de EtOH al 95%, 0,2mL de cloruro de aluminio al 10%, 0,2mL de acetato de potasio 1M. Se deja reposar 40 min a temperatura ambiente, protegido de la luz y se mide la absorbancia a 434nm. Se realiza una curva de calibración con rutina (10-100ug/ml) el contenido de flavonoides se expresó como equivalentes en miligramos de rutina por gramo de madera (mg RutE/g)

Solución madre de rutina: 50mg de rutina en 100ml de EtOH 80%.

Cloruro de aluminio 10%: 10g de AlCl<sub>3</sub> en 100 ml de agua destilada

Acetato de potasio (KAc) 1M: 9.8g de KAc en 100ml de agua destilada

#### **M3.3.3 Extracción con dietil-éter (segunda tanda)**

Luego de filtrar la muestra el solvente orgánico se evapora a 40°C y presión reducida y el solvente acuoso se concentra 3 veces en *speed vac*, (45°C, tiempo 2hs 30). . Las soluciones resultantes se acidifican con 2 gotas de HCl y se extraen 3 veces con 5ml de dietil-éter (cuando se trabaja con 1g de muestra). La fase acuosa se lleva a 10 ml con agua destilada y la fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se evapora el dietil éter a presión reducida y el residuo se recupera en 3-5ml de metanol.

#### **M3.3.4 Análisis por MALDI TOF**

Las muestras liofilizadas se resuspenden en metanol (concentración 4mg/ml) y se mezclan en volúmenes iguales con las matrices CHCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico) y DHB (ácido 2,5-dihidroxi benzoico), también en metanol (10mg/ml). Para aumentar la formación de iones se adiciona una solución de NaCl (10mg/ml), 1μl de la mezcla se deposita en la placa y luego de evaporado el solvente se introduce en el equipo Bruker Reflex III MALDI-TOF Mass Spectrometer. La fuente de irradiación es por pulsos con

laser de nitrógeno a una longitud de onda de 337 nm, las medidas se obtienen en las siguientes condiciones: duración de los pulsos 3 ns, modo de reflexión lineal positivo, voltaje 19 kV. El análisis de los espectros obtenidos se realiza en el programa Flex Analysis.

### M3.3.5 Cálculo de incertidumbre

Todos los ensayos de extracción se realizaron por duplicado y los valores de fenoles totales, taninos hidrolizables y condensados se expresan con la incertidumbre expandida (U) con un factor de cobertura  $k = 2$  (probabilidad de cobertura aproximada de 0.95).

La desviación estándar para cada muestra fue calculada como la incertidumbre estándar (u), que tiene en cuenta errores aleatorios y sistemáticos y a partir de la cual se calcula la varianza combinada ( $S^2p$ ) con grados de libertad  $v = n - 1$ , que permite calcular U. Previamente se corroboró, mediante la prueba F, que no hay evidencia significativa, con nivel de significación de 0.05, para rechazar la homogeneidad de varianzas.

La varianza combinada se calcula según ( $S^2p$ ):

$$S^2p = [(v_1)u_1^2 + (v_2)u_2^2 + \dots + (v_n)u_n^2] / (v_1 + v_2 + \dots + v_n)$$

Donde  $v_1$  el grado de libertad muestras con incertidumbre  $u_1$ ,  $v_2$  el número de muestras con desviación estándar  $u_2$  hasta  $v_n$

La incertidumbre expandida se calcula según

$$U = 2Sp / \sqrt{n}$$

Donde n es el número total de muestras para cada medida.

La incertidumbre de los valores obtenidos de flavonoides se calculó a partir de la diferencia entre ellos que permite determinar la desviación estándar cuando la muestra es la misma según el siguiente modelo:

$$X_1 = m + \varepsilon_{sist1} + \varepsilon_{alet1}$$

$$X_2 = m + \varepsilon_{sist2} + \varepsilon_{alet2}$$

$$X1-X2= \varepsilon_{sist1}- \varepsilon_{sist2} + \varepsilon_{alet3}$$

Donde  $m$  es la concentración real de flavonoides,  $X1$  y  $X2$  son los valores medidos de concentración de flavonoides antes y después del fraccionamiento,  $\varepsilon_{sist}$  es el error sistemático y  $\varepsilon_{alet}$  es el error aleatorio asociados a cada medida.

Como el error sistemático es fijo solamente se considera en el cálculo de la incertidumbre al error aleatorio entonces la varianza  $V_3$  correspondiente a las diferencias de valores medidos (antes y después del fraccionamiento) viene dada por:

$$V_{\varepsilon_{alet3}}=V_{\varepsilon_{alet1}}+ V_{\varepsilon_{alet2}} = V_3$$

Suponiendo además, que la varianza es constante (e igual a  $\sigma^2$ ) para los valores medidos antes y después del fraccionamiento, se tiene que:

$$V_3= 2\sigma^2$$

En consecuencia, la estimación  $S$  de la desviación estándar  $\sigma$  vendrá dada por:

$$S=S_3/\text{raíz de } 2$$

siendo  $S_3$  la desviación estándar muestral correspondiente a las diferencias medidas

### **M3.3.6 Análisis exploratorio de datos**

Para determinar si existen diferencias significativas en las medidas realizadas en la segunda extracción se realiza la prueba  $T$  para muestras emparejadas con un valor  $P$  de dos colas y un  $\alpha=0.05$ . Si el valor  $t$  obtenido es mayor a 0.05 la variación en la nueva medida se considera como no significativa en el ensayo.

## **M3.4 Ensayos de actividad antimicrobiana**

### **M3.4.1 Preparación de inóculos**

#### **M3.4.1.a Suspensión de esporas**

Se siembra por picadura placas de PDA y se incuban 5 días a 28°C. Se recogen las esporas con 2-3ml de solución tween 0.01% y raspando la superficie suavemente con una espátula estéril. La solución se transfiere a tubo estéril y se homogeniza con vortex.

Si es necesario se filtra con blutex estéril (en caso de tener mucho micelio en la solución). La cuantificación se realiza en cámara de Thoma. Se coloca un portaobjetos con bordes humedecidos sobre la misma y luego se agregan 20 µL de la suspensión homogenizada hasta que cubra la cámara totalmente. Se realiza el recuento en microscopio con aumento 40X todos los cuadrados (16) y se calcula según:

$$N^{\circ} \text{ esp /ml} = (\text{esp contadas} / 0.00025 \times 16 \times 16) \times 1000$$

Se preparan suspensiones con una concentración de  $1 \times 10^5$  esp/ml

#### M3.4.1.b Suspensión de células bacterianas

Se siembran por estriación placas de TSA y con el cultivo fresco se realizan cultivos líquidos de 3ml a partir de una colonia aislada en medio TSB y se incuba a 37°C 24 hs *S.aureus* y 48hs *C.michiganensis sub michiganensis*. Una vez transcurrido este tiempo una alícuota de 2 ml se centrifuga 2 minutos a 10000 rpm. El pellet se resuspende en 1.5ml de Suero fisiológico y se mide DO<sub>600</sub>.

Se preparan inóculos con DO<sub>600</sub> 0.1 equivalente a  $1 \times 10^8$  cel/ml

#### **M3.4.2 Ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM, Tiozzo *et al.*, 1998)**

Se utiliza una placa de 96 pocillos para determinar la MIC en medio líquido por diluciones seriadas al medio de las proteínas/extractos y se enfrentan a suspensiones de conidias/espores de los hongos en medio PDB (ver sección anterior). Se prepara una solución A y se inoculan 140 µL en los pocillos correspondientes a la fila A de la placa. Se prepara una solución B y se inoculan 100 µL en el resto de los pocillos. En la fila A se inoculan 60 µL de las muestras y se realizan diluciones seriadas al medio hasta la fila H. La columna 12 se utiliza como control de crecimiento sin muestra. En otra columna, cuando sea necesario se agregan 60 µL sulfato de cobre (2 mg/mL) y benomil (6 mg/mL) (ensayos con extractos). Se incuban a tiempo y temperatura correspondiente para cada microorganismo y se observa efectos macroscópicos en la inhibición/disminución del crecimiento. Se define como mínima concentración inhibitoria, la dilución mayor en la que se observa este efecto

Solución A: 20 µL suspensión conidias/espores y 120 µL de medio correspondiente Hongo/bacteria

Solución B: 10  $\mu\text{L}$  suspensión conidias/esporas, 60  $\mu\text{L}$  medio correspondiente hongo/bacteria y 30 $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O destilada.

#### **M3.4.3 Estandarización de concentraciones de fungicidas usados como control**

Se prepara la placa de microdilución de la misma forma que en la sección anterior (soluciones A y B) y se inocula con 60  $\mu\text{L}$  de benomil (150 mg/ml) y de sulfato de cobre (30 mg/ml) . Se realizan diluciones seriadas al medio y se incuba tiempo y temperatura adecuado. Se utiliza como control una fila sin fungicida para comparar el crecimiento. El ensayo se realiza con los cuatro hongos y se determina la mínima concentración donde existe crecimiento por lo menos en las ultimas 3 diluciones.

#### **M3.4.5 Observación al microscopio y reaislamiento**

A partir de los pocillos donde se observa macroscópicamente la inhibición/disminución del crecimiento se realiza un re aislamiento en placa PDA y se incuba a 28°C durante 5 días para determinar si el efecto es bactericida o bacterioestático y se realiza un fresco para la observación al microscopio.

#### **M3.4.6 Ensayo de doble capa en medio sólido.**

##### M3.4.6.a Ensayo piloto de inducción en placa

##### i) Optimización de método de siembra e inóculo de cepa reportera

Se realiza un precultivo durante toda la noche en 3mL LB ampicilina sembrado con 1 colonia aislada de la cepa Rgp32GFPc1 (gen reportero) a 37°C y 150 rpm. Se inoculan con 150  $\mu\text{L}$  de precultivo por cuadruplicado tubos con 3 ml de LB ampicilina y se incuban a 37°C a 150 rpm hasta una  $\text{DO}_{600} = 0,5-0,7$ , a partir de los cuales se preparan inóculos 10x, 0, -1 y -2 que se siembran en el medio sólido. Se observa fluorescencia de GFP a 395nm durante varios días.

Las siembras se realizan en superficie de la siguiente manera:

- línea con ansa (aproximadamente 20  $\mu\text{L}$ ),
- línea con pipeta 5, 10, 20, 30, 50 $\mu\text{L}$
- spots con 5 y 10  $\mu\text{L}$

Preparación de inóculos

Inóculo	Cél/ $\mu\text{L}$	
10x	$5 \times 10^6$	Concentrar 2mL cultivo, centrifugar, eliminar 1,8mL sobrenadante
0	$5 \times 10^5$	DO=0.5
Dil -1	$5 \times 10^4$	Dilucion al décimo Vf = 500 $\mu\text{L}$
Dil -2	$5 \times 10^3$	Dilucion al décimo Vf = 500 $\mu\text{L}$

ii) Efecto de la sobre capa sobre el crecimiento de la cepa reportera.

Se siembran por duplicado en placas de LB ampicilina una gota de 5  $\mu\text{L}$  de inóculo 10X de cepa reportera en zonas donde previamente se sembraron 20  $\mu\text{L}$  de IPTG 800mM. A uno de los duplicados se le agrega la sobre capa del medio (sin inocular) y se incuban ambos a 28°C (temperatura de producción péptido en medio líquido). Se observa fluorescencia GFP a 395nm cada 6 hs, varios días hasta que la fluorescencia desaparezca.

iii) Efecto de la ampicilina sobre el crecimiento del microorganismo blanco

Se siembran los inóculos preparados en una placa de LB y otra de LB ampicilina en zonas donde previamente se sembraron 20  $\mu\text{L}$  de IPTG 800mM. Se agrega a cada placa la sobre capa de agar con inóculo de microorganismo blanco y se incuban a 28°C (temperatura de producción péptido en medio líquido). Se observa fluorescencia GFP a 395 nm y crecimiento de microorganismo blanco. Para los aquellos donde se detecta inhibición del crecimiento por acción de la ampicilina se utilizan placas de LB y los inóculos se siembran adicionados con ampicilina.

Sobre capa de agar: medio de cultivo para cada microorganismo blanco con 0.6% de agar.

#### M3.4.6.b Método de *screening* de doble capa

Se realiza un precultivo de la cepa productora durante toda la noche a 37°C 150 rpm en 3mL LB ampicilina. Se inocula con 150  $\mu\text{L}$  de precultivo, tubos con 3 ml de LB ampicilina y se incuban a 37°C a 150 rpm hasta una  $DO_{600} = 0,5-0,7$ . Se siembran spots de 5ul de inóculos 10X del cultivo adicionado con ampicilina, en placas LB previamente que

contienen en la zona a sembrar 25  $\mu$ L de IPTG 800mM. Se agrega la sobre capa de agar con inóculo de microorganismo blanco y se incuba a 28°C el tiempo adecuado. Se sigue el ensayo periódicamente.

#### **M3.4.7 Método de *screening* en medio líquido**

Se realiza un precultivo de cepa productora durante toda la noche en 3mL LB ampicilina a 37°C y 150 rpm. Se inoculan con 500  $\mu$ L de precultivo tubos con 10 ml de LB ampicilina y se incuban a 37°C a 150 rpm hasta una  $DO_{600} = 0,5-0,7$ . Posteriormente se separa el cultivo en 2 matraces de 5mL c/u y uno de ellos se induce con 5 $\mu$ L IPTG 800mM y se incuban 24 hs a 28°C. Se toman dos alícuotas de 500  $\mu$ L y se centrifugan a 10000rpm por 2 minutos y el pellet se resuspende en 500  $\mu$ L de buffer de lisis. A una de ellas se la somete a rondas de sonicado y a otra no (ver técnicas utilizadas con proteínas). Se realiza un ensayo de microdilución con ambas alícuotas.

# Bibliografía

---

- Abdallah NA, Shah D, Abbas D, Madkour M. 2010. Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to fusarium wilt. *GM Crops* 1: 344-350.
- Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH. 1999. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agr Food Chem* 47:4184-4188.
- Aerts AM, Francois IE, Meert EM, Li Q-T, Cammue BP, Thevissen K. 2007. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 243-247.
- Archer GL, 1998. *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. *Clin. Infect. Dis* 26: 1179-1181.
- Backa S, Gierer J, Reitberger T, Nilsson T. 1993. Hydroxyl radical activity associated with the growth of white rot fungi. *WOOD RES-SLOVAKIA* 47: 181-187.
- Bals R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res* 1: 141-150.
- Barraco-Vega M, Romero H, Richero M, Cerdeiras MP, Cecchetto G. 2017. Functional characterization of two novel purine transporters from the Basidiomycota *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 601: 1-10.
- Bate-Smith EC. 1977. Astringent tannins of *Acer species*. *Phytochem* 16: 1421-1426.
- Bate-Smith EC, T. Swain. 1962. Flavonoid compounds. *Comparative biochemistry*. Academic Press, New York 755-809.
- Benko-Iseppon AM, Galdino SL, Calsa T, Kido EA, Tossi A, Belarmino LC, Crovella S. 2010. Overview on plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci* 11: 181-188.
- Bianchi S, Krosiakova K, Janzon R, Mayer I, Saake B, Pichelin F. 2015. Characterization of condensed tannins and carbohydrates in hot water bark extracts of European softwood species. *Phytochem* 120: 53-61.
- Bi Athomo AB, Safou-Tchiama R, Santiago-Medina FJ, Cabaret T, Pizzi A, Charrier B, 2018 .Chemical composition of African mahogany (*K. ivorensis A. Chev*) extractive and tannin structures of the bark by MALDI-TOF. *Ind Crops Prod* 113: 167-178.
- Block H, Maertens M, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schafer F. 2009. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): a Review. *Meths. Enzymol.* 463: 439-473.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.
- Bommarius B, Jenssen H, Elliott M, Kindrachuk J, Pasupuleti M, Gieren H, Jaeger KE, Hancock RE, Kalman D. 2010. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Peptides* 31: 1957-1965.
- Bond, Stephen & Naus, Christian. 2012. RF-Cloning.org: An online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic acids research.* 40: 209-213.
- Bossu CM, Ferreira EC, Chaves FC, Menezes EA, Nogueira ARA. 2006. Flow injection system for hydrolysable tannin determination. *Microchemical Journal* 84: 88-92.

- Boudet AM. 2007. Review: Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochem.* 68: 2722–2735.
- Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* 77: 451–459.
- Broekaert WE, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108: 1353–1358.
- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238–250.
- Brown KL, Hancock RE. 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 24–30.
- Buzzini P, Arapitsas P, Goretti M, Branda E, Turchetti B, Pinelli P, Ieri F, Romani A. 2008. Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. *Mini-Rev. Med. Chem.* 8: 1179–1187.
- Cantrell CL, Dayan FE, Duke SO. 2012. Natural products as sources for new pesticides. *J. of Nat Prod.* 75: 1231–1242.
- Carvalho AO, Gomes VM. 2009. Plant defensins-prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* 30: 1007–1020.
- Carvalho E, Povoas MJ, Mateus N, de Freitas V. 2006. Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions. *J. Sci. Food Agric.* 86: 891–896.
- Choi JY, Kwun MJ, Kim KH, Lyu JH, Han CW, Jeong HS, Ha KT, Jung SK, Joo M. 2012. Protective effect of the fruit hull of *Gleditsia sinensis* on LPS-induced acute lung injury is associated with Nrf2 activation. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 97:471–478.
- Coggins C. 2003. European Union restrictions on use of CCA-treated timber. British Wood Preserving and Damp-proofing Association. United Kingdom.
- Correa A, Ortega C, Obal G, Alzari P, Vincentelli R, Oppezzo P. 2014. Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Front. Microbiol.* 5: 23–31.
- Correa A, Oppezzo P. 2015. Overcoming the Solubility Problem in *E. coli*: Available Approaches for Recombinant Protein Production. Elena García-Fruitós (ed.), *Insoluble Proteins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 1258.
- Cray JA, Stevenson A, Ball P, Bankar SB, Eleutherio EC, Ezeji TC, Singhal RS, Thevelein JM, Timson DJ, Hallsworth JE. 2015. Chaotropicity: a key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33: 228–259.
- Cushnie TPT, Lamb AJ. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26: 343–356.
- de Beer A, Vivier MA. 2008. Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. *BMC Plant Biol.* 8: 75–87.
- de Beer A, Vivier MA, 2011. Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding. *BMC Research Notes* 4: 459–478.
- De Coninck B, Cammue B, Thevissen K. 2013. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biol Rev.* 26: 109–120.
- de Freitas V, Carvalho E, Mateus M. 2003. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem.* 81: 503–509.

- de Medeiros LN, Angeli R, Sarzedas CG, Barreto-Bergter E, Valente AP, Kurtenbach E, Almeida FC. 2010. Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1798: 105–113.
- de Oliveira Dias R, Franco OL. 2015. Cysteine-stabilized  $\alpha\beta$  defensins: From a common fold to antibacterial activity. *Peptides* 72: 64–72.
- de Paula VS, Razzera G, Barreto-Bergter E, Almeida FCL, Valente AP. 2011. Portrayal of complex dynamic properties of sugar cane defensin 5 by NMR: multiple motions associated with membrane interaction. *Structure* 19: 26–36.
- Deng T, Ge H, He H, Liu Y, Zhai C, Feng L, Yi L. 2017. The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. *Protein Expr. Purif.* 140: 52-59.
- de Oliveira Dias R, Franco RL. 2015. Cysteine-stabilized defensins: From a common fold to antibacterial activity. *Peptides* 72: 64–72.
- Díaz-Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Dalla-Rizza M. 2011. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungi *Alternaria* sp. *Chil. J. Agr. Res.* 71: 231-239.
- Dunn PE, 1968. Biochemical aspects of insects immunology. *Ann. Rev. Entomol.* 31: 321-32.
- Durrant WE, Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185–209.
- Eaton RA, Hale MDC. 1993 *Wood: decay, pests and protection*. Chapman and Hall Ltd. 1st ed. London, New York.
- Ebenhan T, Gheysens O, Kruger HG, Zeevaart JR, Sathekge MM. 2014 .Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *Bio. Med. Res. Int.* 86: 73-81.
- Erijman A, Dantes A, Bernheim R. 2011. Transfer-PCR (TPCR): a highway for DNA cloning and protein engineering. *J. Struct. Biol.* 175: 171–177.
- Ermakova EA, Faizullin DA, Idiyatullin BZ, Khairutdinov BI, Mukhamedova LN, Tarasova NB, Toporkova YY, Osipova EV, Kovaleva V, Gogolev YV, Zuev, Yuriy F. Nsmelova, Irina V. 2016. Structure of Scots pine defensin 1 by spectroscopic methods and computational modeling. *Int. J. Biol. Macromol.* 84: 142–152.
- Gao AG, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang J, Rommens CM. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 18: 1307-1310.
- Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J, Gräfen I, Eichenlaub R, Burger A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnol.* 105: 179-191 .
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S. 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent. Eur. J. Biol.* 2: 1–33.
- Glassel D, Mellema GE. 2006. Protection of construction materials from pests. US patent no. US 200601343 41A1.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29: 644-652.

- Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol.Aspects Med.* 27: 1-93.
- Hammarstrom M, Hellgren N, van Den Berg S, Berglund H, Hard T. 2002. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 11: 313–321.
- Hammel KE, Kapich AN, Jensen KA, Ryan ZC. 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 445–453.
- Hancock RE, Sahl HG. 2006. Antimicrobia land host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24: 1551–1557.
- Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochem.* 48: 125–129.
- Haslam E, 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59: 205-215.
- Haslam E, 1998. Practical Polyphenolics - From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge University Pres. United Kindom.
- Haslam E. 2007. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime *Phytochem.* 68: 2713–2721.
- Haslam E. 1965. Galloyl esrers in the *Aceraceae*. *Phytochem.* 4: 495-498.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59: 205–215.
- Hayden NJ, Maude RB. 1992. The role of seed-borne *Aspergillus niger* in transmission of black mould of onion. *Plant Pathol.* 41: 573-581.
- Hayek SA, Gyawali R, Ibrahim SA. 2013. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. *Antimicrobial Natural Products*. A. Méndez-Vilas Ed.
- Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of *Tunisian Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruit extracts. *Food Chem.* 105: 1126–1134.
- Hegedüs N, Marx F. 2012. Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal biol. Rev.* 26: 132-145.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13: 572–584.
- Herbel V, Schafer H, Wink M. 2015. Recombinant production of Snakin-2 (an antimicrobial peptide form tomato) in *E. coli* and analysis of its bioactivity. *Molecules* 20: 14889-14901.
- Hirano T, Enoki A, Tanaka H. 2000. Immunogold labelling of an extracellular substance producing hydroxyl radicals in wood degraded by brown rot fungus *Tyromyces palustris*. *J. Wood. Sci.* 46: 45–51.
- Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, Gentz R, Stüber D. 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 6: 1321–1325.
- Hochuli E, Döbeli H, Schacher A. 1987. New metal chelate adsorbent for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 411: 177–184.
- Hoong YB, Pizzi A, Tahir PD, Pasch H. 2010. Characterization of Acacia mangium polyflavonoid tannins by MALDI-TOF mass spectrometry and CP-MAS <sup>13</sup>C NMR. *Eur. Polym. J.* 46: 1268–1277.

- Hsu FL, Yen TB, Chang HT, Chang ST. 2007. Antifungal activity and synergistic effect of cinnamaldehyde combined with antioxidants against wood decay fungi. International Research Group on Wood Protection Beijing, China 09: 32-38.
- Hwang WJ, Kartal SN, Yoshimura T, Imamura Y. 2007. Synergistic effect of heartwood extractives and quaternary ammonium compounds on termite resistance of treated wood. *Pest Manag. Sci.* 63: 90-95.
- Janssen BJC, Schirra HJ, Lay FT, Anderson MA, Craik DJ. 2003. Structure of *Petunia hybrida* Defensin 1, a Novel Plant Defensin with Five Disulfide Bonds. *Biochemistry* 42: 8214-8222.
- Jasso de Rodríguez D, Trejo-González FA, Rodríguez-García R, Díaz-Jimenez MLV, Sáenz-Galindoc A, Hernández-Castillo FD, Villarreal-Quintanilla JA, Peña-Ramosa FM. 2015. Antifungal activity in vitro of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Ind. Crops Prod.* 75: 150–158.
- Johansson A, Bolton Grob R, Mannervik B. 1999. Use of silent mutations in cDNA encoding human glutathione transferase M2-2 for optimized expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 17: 105-112.
- Jungbauer, A., Kaar, W., and Schlegl, R. 2004. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 487–494.
- Kant P, Liu WZ, Pauls KP. 2009. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides* 30: 1593-1599.
- Kaur J, Sagaram US, Shah D. 2011. Can plant defensins be used to engineer durable commercially useful fungal resistance in crop plants? *Fungal Biol. Rev.* 25: 128-135.
- Khairutdinov BI, Ermakova EA, Yusypovych YM, Bessolicina EK, Tarasova NB, Toporkova YY, Kovaleva V, Zueva YF, Nesselova IV. 2017. NMR structure, conformational dynamics, and biological activity of PsDef1 defensin from *Pinus sylvestris*. *BBA Proteins and Proteomics* 1865: 1085–1094.
- Khanbabaee K, van Ree T. 2001. Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18: 641–649.
- Kim JM, Jang SA, Yu BJ, Sung BH, Cho JH, Kim SC. 2008. High-level expression of an antimicrobial peptide histonin as a natural form by multimerization and furin-mediated cleavage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 123–130.
- Kirker GT, Blodgett AB, Arango RA, Lebow PK, Clausen CA. 2013. The role of extractives in naturally durable wood species. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 82: 53-58.
- Konai N, Raidandi D, PizziA, Meva L. 2017. Characterization of *Ficus sycomorus* tannin using ATR-FT MIR, MALDI-TOF MS and <sup>13</sup>C NMR methods. *Eur. J. Wood Prod.* 75: 807-805.
- Koukol J, Conn EE. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236: 2692–2698.
- Kovaleva V, Krynytskyy H, Gout I, Gout R. 2011. Recombinant expression, affinity purification and functional characterization of Scots pine defensin 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 1093-1101.
- Kovalskaya N, Hammonda RW. 2009. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snak1-1 and defensin recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 63: 12–17.

- Kragh KM, Nielsen JE, Nielsen KK, Dreboldt S, Mikkelsen JD. 1995. Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris* L. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8: 424-434.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Mol Biol Evol.* 33: 1870-1874.
- Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. 2018. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* 8: 4-28.
- Lacerda AF, Vasconcelos EAR, Barbosa Pelegrini P, Grosside MF. 2014. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Front. Microbiol.* 5: 116-122.
- LaVallie ER, Lu Z, Diblasio-Smith EA. 2000. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 326: 322-340.
- Lay FM, Anderson MA. 2005. Defensins-components of the innate immune system in plants, *Curr. Protein Pept. Sci.* 6: 85-101.
- Lay FT, Mills GD, Poon IKH, Cowieson NP, Kirby N, Baxter AA, van der Weerden NL, Dogovski C, Perugini MA, Anderson A, Kvensakul M, Hulett MD. 2012. Dimerization of Plant Defensin NaD1 Enhances Its Antifungal Activity. *J. Biol. Chem.* 287: 19961-19972.
- Le Bourvellec C, Renard CMGC. 2012. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms, *Critical Reviews. Food Sci. Nutr.* 52: 213-248.
- Li C, Haug T, Styrvold OB, Jorgensen TO, Stensvag K. 2008. Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 1430-1440.
- Li JF, Zhang J, Zhang Z, Kang CT, Zhang SQ, 2011. SUMO mediating fusion expression of antimicrobial peptide CM4 from two joined genes in *Escherichia coli*. *Cur. Microbiol.* 62: 296-300.
- Li M, Su ZG, Janson JC. 2004. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.* 33: 1-10.
- Limn SH, Darah I, Jain K. 2006. Antimicrobial activities of Tannin extracted from *Rhizophora apiculata* barks. *J. Trop. For. Sci.* 18: 59-65.
- Lister R, Gregory BD, Ecker JR. 2009. Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 107-118.
- Lobo DS, Pereira IB, Fragel-Madeira L, Medeiros LN, Cabral LM, Faria J. 2007. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46: 987-996.
- Lotz RW. 1993. Wood preservation system including halogenated tannin extracts. US patent no. 5270083.
- Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. 2016. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6: 194 - 206.
- Martinez-Florez S, Gonzalez-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17: 271-278.
- Martínez-Minaya J, Conesa D, López-Quílez A, Vicen A. 2015. Climatic distribution of citrus black spot caused by *Phyllosticta citricarpa*. A historical analysis of disease spread in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 143: 69-83.
- Martinez-Sotres C, Lopez-Albarran P, Cruz-de-Leon J, Garcia-Moreno T, Rutiaga-Quinones JG, Vazquez-Marrufo G, Tamariz-Mascarua J, Herrera-Bucio R. 2012.

- Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 69: 38-40.
- Martinez-Sotres C, Rutiaga-Quinones JG, Herrera-Bucio R, Gallo M, Lopez-Albarran P. 2015. Molecular docking insights into the inhibition of laccase activity by medicarpin. *Wood Sci. Technol.* 49: 857-862.
- Mateus N, Pinto R, Ruao P, de Freitas V. 2004. Influence of the addition of grape seed procyanidins to Port wines in the resulting reactivity with human salivary proteins. *Food Chem.* 84: 195-200.
- Mendez E, Moreno A, Colilla F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, Soriano F, Salinas M, de Haro C. 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, g-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.* 194: 533-539.
- Mihajlovic M, Lazaridis T. 2010. Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochim. Biophys. Acta* 1798: 1494-1502.
- Mitchell R, Sleeter TD. 1980. Protecting wood from wood degrading organisms. US patent no. 4220688.
- Mohammed RS, Abou Zeid AH, El Hawary SS, Sleem AA, Ashour WE. 2014. Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos L.* leaves Saudi J. Biol. Sci. 21: 547-553.
- Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S, 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemi.* 26: 2231-2234.
- Mutasa-Göttgens ES, Joshi A, Holmes HF, Hedden P, Göttgens B. 2012. A new RNASeq-based reference transcriptome for sugar beet and its application in transcriptome-scale analysis of vernalization and gibberellin responses. *BMC Genomics* 13: 99-117.
- Naima R, Oumama M, Hannache H, Sesboue A, Charrier B, Pizzi A, Charrier F, Bouhtoury El. 2015. Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Ind. Crops Prod.* 70: 245-252.
- Nallamsetty DS, Waugh A. 2007. Generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* using a combinatorial His6-maltose binding protein fusion tag. *Nat. Protoc.* 2: 383-391.
- Naumann D, Tedeschi LO, Zeller WE, Huntley NF. 2017. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions R. Bras. Zootec. 46: 929-949.
- Navarrete P, Pizzi A, Pasch H, Rode K, Delmotte L. 2010. MALDI-TOF and <sup>13</sup>C NMR characterization of maritime pine industrial tannin extract. *Ind. Crops Prod.* 32: 105-110.
- Nawrot R, Barylski J, Nowicki N, Broniarczyk J, Buchwald W, Goździcka-Józefiak A. 2013. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol.* 59: 181-196.
- Nebel JP, Porcile JF. 2006. La contaminación del bosque nativo por arbóreas y arbustivas exóticas. Dirección Nacional Forestal, MGAP.
- Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 29: 464-472.
- Niessen WMA, Falck D. 2015. Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry, a tutorial Ed1 . *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Oard S, Karki B. 2006. Mechanism of b-purothionin antimicrobial peptide inhibition by metal ions: molecular dynamics simulation study. *Biophys. Chem.* 121: 30–43.
- Ohemeng KA, Schwender CF, Fu KP, Barrett JF, 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3: 225–230.
- Okuda T, Hatano T, Yoshida T. 1989. New methods of analysing tannins. *J. Nat. Prod.* 52: 1–31.
- Padovan L, Scocchi M, Tossi A. 2010. Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 11: 210-219.
- Parachin NS, Mulder KC, Viana AA, Dias SC, Franco OL. 2012. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38: 446-445.
- Parisi K, Shafee TMA, Quimbar P, van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA. 2018. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 134-159.
- Pasch H, Pizzi A, Rode K. 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins. *Polym.* 42: 7531–7539.
- Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. 2012. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32: 143–171.
- Pattenden LK, Thomas WG. 2008. Amylose affinity chromatography of maltose-binding protein: purification by both native and novel matrix-assisted dialysis refolding methods. *Methods Mol. Biol.* 421: 169–189.
- Pechsrichuang P, Songsiririthigul C, Haltrich D, Roytrakul S, Namvijitr P, Bonaparte N, Yamabhai M. 2016. OmpA signal peptide leads to heterogenous secretion of *B. subtilis* chitosanase enzyme from *E. coli* expression system. *Springerplus* 5:1200-1210.
- Peng L, Xu Z, Fang X, Wang F, Yang S, Cen S. 2004. Preferential codons enhancing the expression level of human beta-defensin-2 in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Pept. Lett.* 11: 339-344.
- Person AK, Chudgar SM, Norton BL, Tong BC, Stout JE. 2010. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Med. Microbiol.* 59: 834–838.
- Pestana-Calsa C, Ribeiro I, Calsa J. 2010. Bioinformatics-coupled molecular approaches for unravelling potential antimicrobial peptides coding genes in Brazilian native and crop plant species. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11: 199-209.
- Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. 2010. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs?. *PLoS Pathog.* 6: 13 -25.
- Pinelo M, Del Fabbro P, Marzocco L, Nunez MJ, Vicoli MC. 2005. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by products. *Food Chem.* 92: 109–117.
- Ping L, Pizzi A, Guo ZD, Brosse N. 2011. Condensed tannins extraction from grape pomace: Characterization and utilization as wood adhesives for wood particleboard. *J. Ind.Crops Prod.* 34: 907-914.
- Piotrowski JS, Okada H, Lu F, Li SC, Hinchman L, Ranjan A, Smith DL, Higbee AJ, Ulbrich A, Coon JJ, Deshpande R, Bukhman YV, McIlwain S, Ong IM, Myers CL, Boone C, Landick R, Ralph J, Kabbage M, Ohya Y. 2015. Plant-derived antifungal agent poacic acid targets b-1,3-glucan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 3: 24-32.
- Pizzi A, Pasch H, Rode K, Giovando S. 2009. Polymer Structure of Commercial Hydrolyzable Tannins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Appl. Polym. Sci.* 113: 3847–3859.

- Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 530-536.
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-603.
- Portieles R, Ayra C, Gonzalez E, Gallo A, Rodriguez R, Chacón O, López Y, Rodriguez M, Castillo J, Pujol M, Enriquez G, Borroto C, Trujillo L, Thomma BP, Borrás-Hidalgo O. 2010. NmDef02: a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 8: 678-690.
- Priyanka C, Kumar P, Bankar S, Karthik L. 2014. In vitro antibacterial activity and GCMS analysis of *Acacia karoo* and *Ziziphus mauritiana* extracts. *J. Taibah Univ. Sci.* 14: 64-85.
- Quideau S, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouys EGU, Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int.* 50: 586-621.
- Ramamoorthy V, Zhao X, Snyder A.K, Xu JR, Shah DM. 2007. Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. *Cell Microbiol.* 9: 1491-1506.
- Rapaport D, Shai Y. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 266: 23769-23775.
- Rasmussen S, Dixon RA. 1999. Transgene-mediated and elicitor- induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 11: 1537- 1551.
- Ricci A, Parpinello GP, Palma AS, Teslić N , Brilli C, Pizzi A, Versari A. 2017. Analytical profiling of food-grade extracts from grape (*Vitis vinifera* sp.) seeds and skins, green tea (*Camellia Sinensis*) leaves and Limousin oak (*Quercus robur*) heartwood using MALDITOF- MS, ICP-MS and spectrophotometric methods. *J. Food Compos. Anal.* 17: 315- 329.
- Ricci A, Lagel MC, Parpinello GP, Pizzi A, Kilmartin PA, Versari A. 2016. Spectroscopy analysis of phenolic and sugar patterns in a food grade chestnut tannin. *Food Chem.* 203: 425-429.
- Ricco RA, Agudelo IJ, Wagner . 2015. Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa* 52: 161-174.
- Rice P, Longden I, Bleasby A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16:276-277.
- Richard T, Vitrac X, Merillon JM, Monti JP. 2005. Role of peptide primary sequence in polyphenol-protein recognition: An example with neurotensin. *Biochim. Biophys Acta* 3: 238-243.
- Rodriguez Decuadro S. 2018 Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de la República.
- Rodriguez Decuadro S, Barraco Vega M, Dans PD, Pandolfi V, Benko Iseppon AM, Cecchetto G. 2018. Antimicrobial and structural insights of a new snakin-like peptide isolated from *Peltophorum dubium* (Fabaceae). *Amino Acids* 50:1245-1259.
- Rozek A, Friedrich CL, Hancock RE. 2000. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochem.* 39: 15765-15774.
- Sagaram US, El-Mounadi K, Buchko GW, Berg HR, Kaur J, Pandurangi RS, Smith TJ, Shah DM. 2013. Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding

- antifungal plant defensin MtDef4: identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. *PLoS On3* 8: 1-22.
- Sathoff AE, Velivelli S, Shah DM, Samac DA. 2019. Plant defensin peptides have antifungal and antibacterial activity against human and plant pathogens. *Phytopathol.* 09-18.
- Scalbert A, 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 30: 3875-3883.
- Scalbert A. 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissue. *Plant Polyphenols*, Hemingway RW and Laks PE eds, Plenum Press, New York 59: 259-280.
- Schagger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Prot.* 1: 16-22.
- Scheffer TC, Cowling E. 1966. Natural resistance of wood to microbial deterioration. *Annu. Rev. Phytopathol.* 4: 147-170.
- Schultz T, Nicholas D. 2002. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochem.* 61: 555-560.
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J, van Dijck P. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*. *Microbiol. Biotechnol.* 59: 426-435.
- Sels J, Mathys J, De Coninck B, Cammue B, De Bolle MF. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 941-950.
- Sengupta D, Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ. 2008. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 2308-2317.
- Shafee TM, Lay FT, Hulett MD, Anderson MA. 2016. The defensins consist of two independent, convergent protein superfamilies. *Mol. Biol. Evol.* 33: 2345-2356.
- Shah DM, Read ND. 2013. Antifungal peptides come of age. *Fungal Biol. Rev.* 26: 107-108.
- Shahat AA, Marzouk MS. 2013. Tannins and Related Compounds from Medicinal Plants of Africa Medicinal Plant Research in Africa. *Pharm. Chem.* 479-555.
- Silva ON, Mulder KCL, Barbosa EAD, Otero-Gonzalez AJ, Lopez-Abarrategui, C, Rezende TMB, Dias, SC, Franco OL. 2011. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Front. Microbiol.* 2: 232-241.
- Silva Y, Portieles R, Pujol M, Terauchi R, Matsumura H, Serrano M, Borrás-Hidalgo O. 2013. Expression of a microbial serine proteinase inhibitor gene enhances the tobacco defense against oomycete pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 84: 99-106.
- Silverstein KAT, Graham MA, Paape TD, VandenBosch KA. 2005. Genome Organization of More Than 300 Defensin-Like Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 600-610.
- Simon C, Barathieu K, Laguerre M, Schmitter JM, Fouquet E, Pianet I, Dufourc EJ. 2003. Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochem.* 42: 10385-10395.
- Singh T, Singh AP. 2012. A review of natural products as wood protectant. *Wood Sci.Tec.* 46: 851-870.
- Sirmah P, Iaych K, Poaty B, Dumarcay S, Gerardin P. 2009. Effect of extractives on durability of *Prosopis juliflora* heartwood. 40th Annual Meeting of International Research Group on Wood Protection, Beijing, China 09: 24-28.

- Skosyrev VS, Kuleskiy EA, Yakhnin AV, Temirov YV, Vinokurov LM. 2003. Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expr. Purif.* 28: 350–356.
- Slavokhotova AA, Shelenkov AA, Odintsova TI. 2015. Prediction of *Leymus arenarius* (L.) antimicrobial peptides based on de novo transcriptome assembly. *Plant Mol. Biol.* 89:203–214.
- Smith-Unna R, Boursnell C, Patro R, Hibberd JM, Kelly S. 2016. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Res.* 26:1134–1144.
- Song X, Zhang M, Zhou Z, Gong W. 2011. Ultra-high resolution crystal structure of a dimeric defensin SPE10. *FEBS Lett.* 585: 300–306.
- Spelbrink RG, Dilmac N, Allen A, Smith TJ, Shah DM, Hockerman GH. 2004. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol.* 135: 2055–2065.
- Stenius P. 2000. *Papermaking Science and Technology, Book 3, Forest Products Chemistry.* Fapet, Helsinki.
- Studier FW. 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41: 207–234.
- Suarez-Carmona M, Hubert M, Delvenne P, Michael H. 2015. Defensins: "Simple" antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine & Growth Factor Rev.* 26: 361–370.
- Sun Y, Li Q, Li Z, Zhang Y, Zhao J, Wang L. 2012. Molecular cloning, expression, purification, and functional characterization of palustrin-2CE, an antimicrobial peptide of *Rana chensinensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 157–162.
- Tascioglu C, Yalcin M, Sen S, Akcay C. 2013. Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. *Intern. Biodeterior. Biodegradation* 85: 23–28.
- Taylor AM, Gartner BL, Morrell JJ, 2002. Heartwood formation and natural durability—a review. *Wood Fiber Sci.* 34: 587–611.
- Terpe K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5: 523–533.
- Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J. 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* 7: 573–588.
- Thevissen K, Cammue BP, Lemaire K, Winderickx J, Dickson RC, Lester RL, Ferket KK, van Even F, Parret AH, Broekaert WF. 2000. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9531–9536.
- Thevissen K, Warnecke DC, Francois IE, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zahringer U, Thomma BP, Ferket KK, Cammue BP. 2004. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* 279: 3900–3905.
- Thevissen K, Kristensen HH, Thomma BP, Cammue B, Francois IE. 2007. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov. Today* 12: 966–971.
- Thomma BPHJ, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 63–68.
- Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K. 2002. Plant defensins. *Planta* 216: 193–202.
- Tiozzo E, Rocco G, Tossi A, Romeo D, 1998. Wide-spectrum antibiotic activity of synthetic, amphipathic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 249: 202–206.

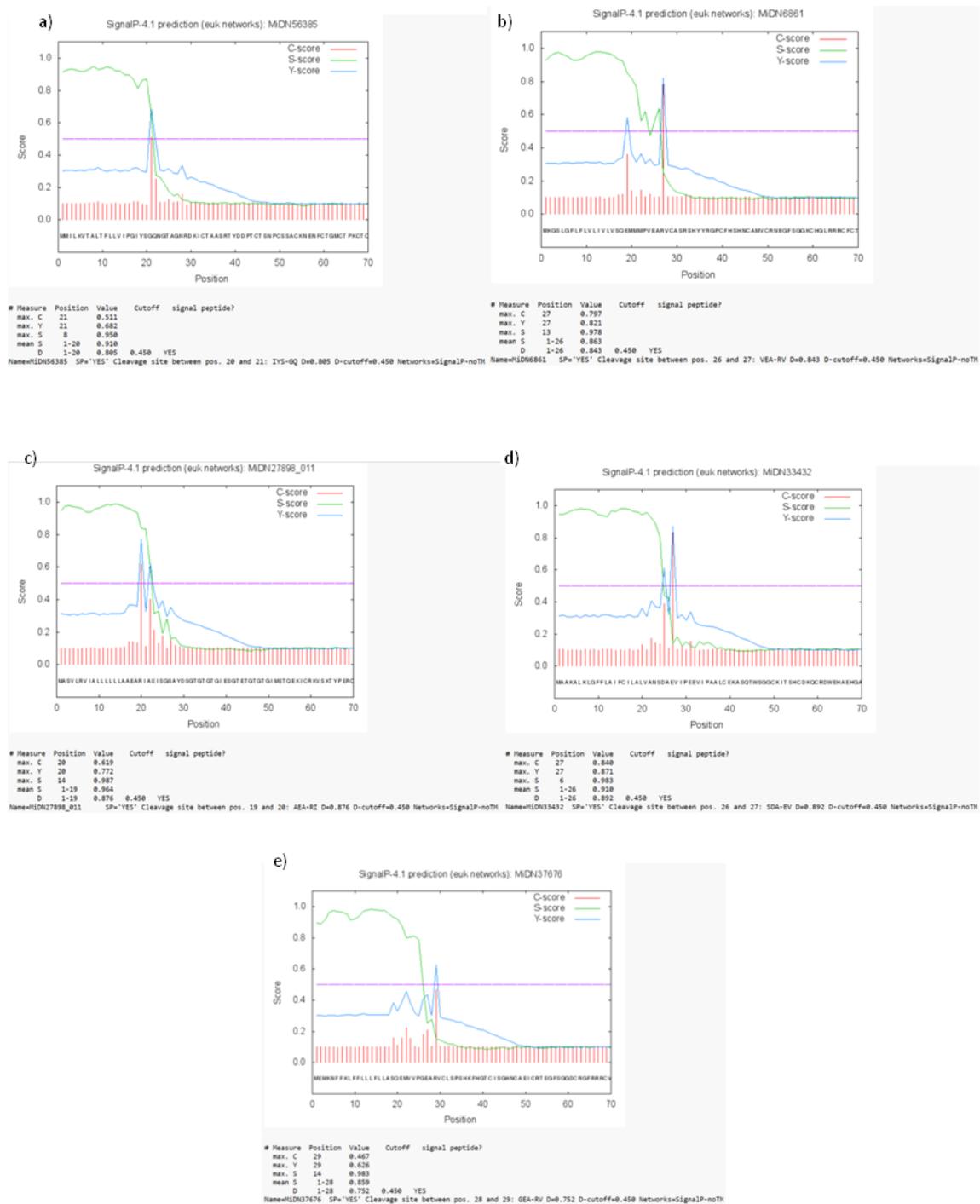
- Tomak ED, Gonultas O. 2018. The Wood Preservative Potentials of Valonia, Chestnut, Tara and Sulphited Oak Tannins. *J. Wood Chem. Technol.* 38: 183-197.
- Tomisawa S, Sato Y, Kamiya M, Kumaki Y, Kikukawa T, Kawano K, Demura M, Nakamura K, Ayabe T, Aizawa T. 2015. Efficient production of a correctly folded mouse  $\alpha$ -defensin, cryptdin-4, by refolding during inclusion body solubilization. *Protein Expr. Purif.* 112: 21-28.
- Tondi G, Pizzi A. 2009. Tannin-based rigid foams: Characterization and modification. *Ind. Crops Prod.* 29: 356-363
- Tondi G, Wieland S, Wimmer T, Thevenon MF, Pizzi A, Petutschnigg A. 2012. Tannin-boron preservatives for wood buildings: mechanical and fire properties. *Eur. J. Wood Prod.* 70:689–696.
- Tondi G, Thevenon MF, Mies B, Standfest G, Petutschnigg S, Wieland S. 2013. Impregnation of Scots pine and beech with tannin solutions: effect of viscosity and wood anatomy in wood infiltration. *Wood Sci. Technol.* 47: 615–626
- Tondi G, Petutschnigg A. 2015. Middle infrared (ATR FT-MIR) characterization of industrial tannin extracts. *Ind. Crops Prod.* 65: 422–428
- Tondi G, Hu J, Rizzo F, Buh J, Medved J, Petutschnigg A, Thevenon MF. 2017. Tannin-caprolactam and Tannin-PEG formulations as outdoor wood preservatives: weathering properties. *Ann. Forest Sci.* 74: 19-31
- Torrent M, Nogués VM, Boix E. 2009. A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial Proteins. *BMC Bioinformatics* 10:373-382.
- Uematsu N, Matsuzaki K. 2000. Polar Angle as a Determinant of Amphipathic  $\alpha$ -Helix-Lipid Interactions: A Model Peptide Study. *Biophys. J.* 79: 2075–2083
- Valente AP, de Paula VS, Almeida FCL 2013. Revealing the Properties of plant defensins through dynamics. *Molecules* 18: 11311–11326.
- Valette N, Perrot T, Sormani R, Gelhaye E, Morel-Rouhier M. 2017. Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biol. Rev.* 31: 113-123.
- van den Ent F, Löwe J. 2006. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* 67: 67–74.
- van der Weerden NL, Bleackley MR, Anderson MA. 2013. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 3545-3570.
- Vek V, Oven P, Humar M. 2013. Phenolic extractives of wound-associated wood of beech and their fungicidal effect. *Intern. Biodeterior. Biodegradation* 77: 91-97.
- Vijayan S, Guruprasad L, Kirti PB. 2008. Prokaryotic expression of a constitutively expressed *Tephrosia villosa* defensin and its potent antifungal activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 1023-1032.
- Voda K, Boh B, Vrtacnik M, Pohleven M. 2003. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 51: 51–59.
- Vriens K, Cools TL, Harvey PJ, Craik DJ, Spincemaille P, Cassiman D, Braem A, Vleugels J, De Coninck B, Cammue BPA, Thevissen K. 2015. Synergistic activity of the plant defensin HsAFP1 and caspofungin against *Candida albicans* biofilms and planktonic cultures. *PloS one* 10: 327-339.
- Wang G, Mishra B, Lau K, Lushnikova T, Golla R, Wang X. 2015. Antimicrobial Peptides in 2014. *PharmH2.* 8: 123-150.
- Whiting DA. 2001. Natural phenolic compounds 1900–2000: a bird’s eye view of a century’s chemistry. *Nat. Prod. Rep.* 18: 583–606.

- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JA. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8: 561-580.
- Wimley WC. 2010. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chem. Biol.* 5: 905-917.
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M. 2011. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* 48: 54-60.
- Yam L, Adams ME. 1998. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J. Biol. Chem.* 273: 2059-2066.
- Yang YF, Lyu PC. 2008. The protein of plant defensin family and their application beyond plant disease control. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences* 2: 214-218.
- Yeaman MR, Yount NY. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacology Reviews* 55: 27- 55.
- Yen TB, Chang HT, Hsieh CC, Chang ST. 2008. Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresour. Technol.* 99: 4871-4877.
- Yilmaz Y, Toledo RT. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* 19: 41-44.
- Yong AN, Ooh KF, Ong HC, Chai TT, Wong FC. 2014. Investigation of antibacterial mechanism and identification of bacterial protein targets mediated by antibacterial medicinal plant extracts. *Food Chemistry* 183: 32-36.
- Yount NY, Yeaman MR. 2013. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Ann N Y Acad Sci* 1277: 127-138.
- Zabel RA, Morrell JJ. 1992. *Wood Microbiology: decay and its prevention* 1 Ed. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Zamani M, Nezafat N, Negahdaripour M, Dabbagh F, Ghasemi Y. 2015. In Silico Evaluation of Different Signal Peptides for the Secretory Production of Human Growth Hormone in *E. coli*. *Int J Pept Res Ther* 21:23-31.
- Zaslloff M. 2002. Antimicrobial Peptide from multicellular organism. *Nature* 415: 389-395.
- Zhou F, Ji B, Zhang H, Jiang H, Yang Z, Li J, Li J, Ren Y, Yan W. 2007a. Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella typhimurium*. *J Food Prot* 70:1704-1709.
- Zhou L, Li D, Jiang W, Qin Z, Zhao S, Qiu M, Wu J. 2007b. Two ellagic acid glycosides from *Gleditsia sinensis* Lam. with antifungal activity on *Magnaporthe grisea*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 21: 303-309.
- Zhou L, Li D, Wang J, Liu Y, Wu J. 2007c. Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 21: 283-291.
- Zhu H, Dean R. 1999. A novel method for increasing the transformation efficiency of *Escherichia coli*. Application for bacterial artificial chromosome library construction. *Nucleic Acids Res* 27: 910-911.
- Zhu XQ, Li SX, He HJ. 2005. On-column refolding of an insoluble His6-tagged recombinant EC-SOD overexpressed in *Escherichia coli*. *Acta Biochim Biophys Sin* 37: 265-269
- Zhu H, Sandiford SK, van Wezel GP. 2014. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41: 371-386.



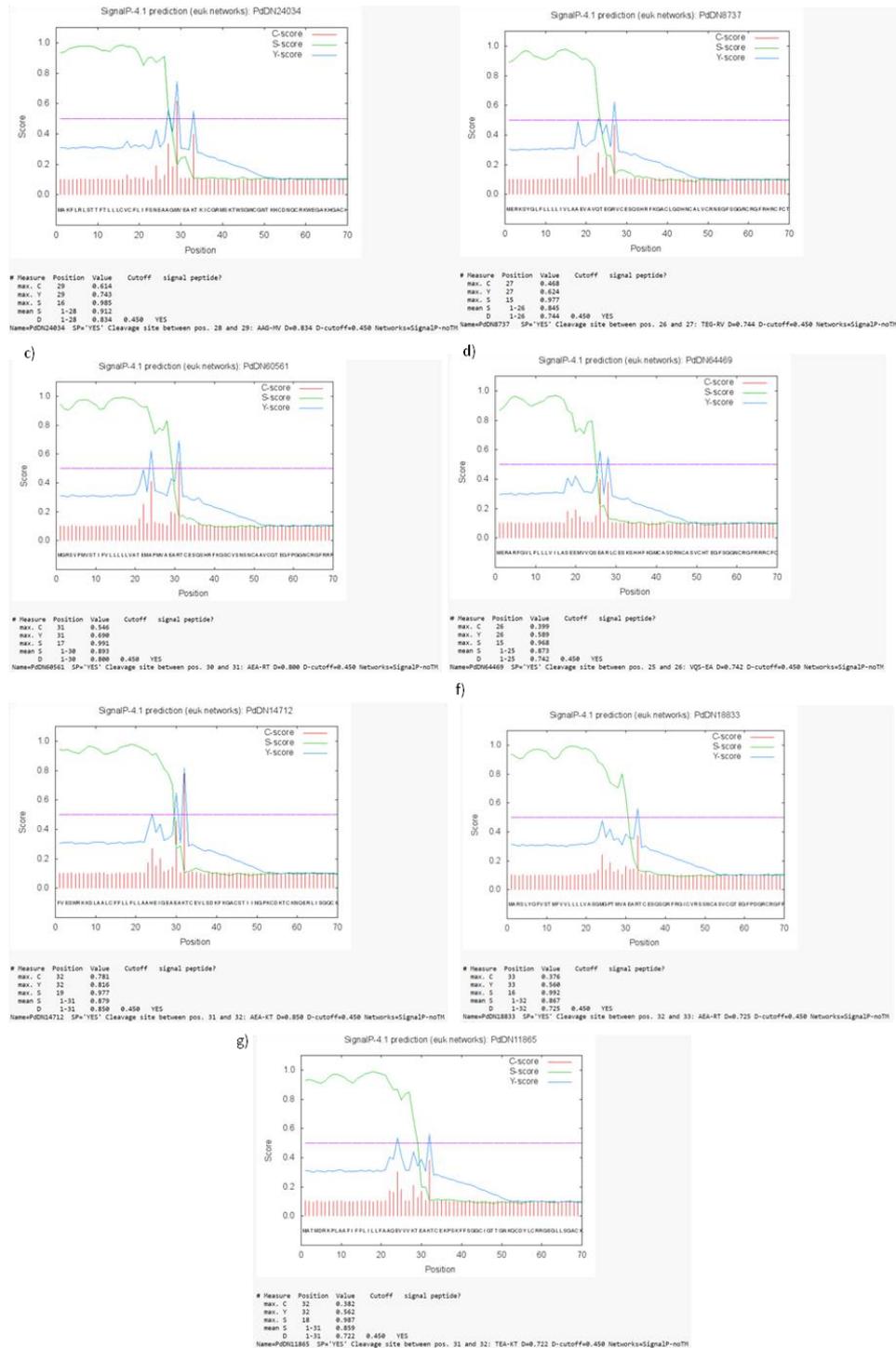
# Anexo 1

**Figura A1.** Gráficos y parámetros obtenidos en el análisis del péptido señal (SignalP 4.1) para los *contigs* de congorosa. a) MiDN 56385. b) MiDN6861. c) MiDN27898. d) MiDN33432. e) MiDN37676.



# Anexo 2

**Figura A2.** Gráficos y parámetros obtenidos en el análisis del péptido señal (SignalP 4.1) para los *contigs* de ibirapitá. a) PdDN24034. b) PdDN8737. c) PdDN60561. d) PdDN64469. e) PdDN14712. f) PdDN18833. g) PdDN11865.



# Anexo 3

---

**Figura A3.** Mapa de *contig* PdDN11865 de ibirapitá. En subrayado se indica el péptido señal y con sombreado las cisteínas conservadas.

**PdDN11865**

M A T M

GCCTCTATAAATAAAGACTTCACTTCCCTGGGCATAACACTGATCAGAACACCTAGTCATTTTGAGCATATTACTAAAGCCAGAAGCAATGGCCACCATG

D R K P L A A F I F F L I L L F A A Q E V V V K T E A K T C E K P  
GACAGGAAACCACTTGCTGCCTTCATCTTCTTTCTCATCCTTCTCTTTGCTGCTCAAGAAGTGGTGGTGAAAACGGAGGCAAGACATGTGAGAAACCAA

S K F F S G G **C** I G T T G N K Q **C** D Y L **C** R R G E G L L S G A **C** K G  
GCAAGTTCTTCTCTGGAGGATGCATTGGGACCACAGGCAACAAACAGTGTGACTATCTGTGCAGGAGAGGAGAAGGATTACTCAGTGGGGCATGCAAAGG

L K **C** V **C** T K A **C** \*  
CCTCAAGTGTGTATGCACTAAAGCTTGCTGAGCATACAACCTCCTCGTATCATCATGCATAAATAAAACGTAGCTGTATATATATATATATATAGCTACTTG

# Anexo 4

**Tabla A4.** Información de defensinas utilizadas en el análisis filogenético obtenidas de bases de datos PDB (Protein Data Bank) y UniProtKB

Nombre	UniProtKB	PDB	Especie	Actividad	Familia	Motivo	Secuencia péptido maduro
PSD1_PEA	P81929	1JKZ	Pisum sativum	<i>A.niger, A.versicolor, F.moniliforme, F.oxysporum, F.solani, N.crassa, S.cerevisiae, T.mentagrophytes</i>	Fabaceae	DEF 35	KTCEHLADTYRGVCFNASCDDHCKNKAHLISGTCHNWKCFCTQNC
NSD1_NICSU	COHK49	5KK4 y 5VYP	<i>Nicotiana suaveolens</i>	unión al ácido fosfátidico precursor de fosfolípidos de membrana	Solanaceae	DEF 35	KDCKRESNTFPGICITKPPCRKACIREKFTDGHCSKILRRCLCTKPC
DEF1_AESHI	Q7M1F3	1BK8	Aesculus hippocastanum	<i>B.cinerea, C.sphaerospermum, F.culmorum, L.maculans, P.digitatum, T.viride, S.tritiei, V.albo-atrum, N.crassa</i>	Sapindaceae	DEF 32	LCNERPSQTSWGNCGNTAHCDKQCQDWEKASHGACHKRENHWKCFYFNC
D1_VIGRA	Q6T418	1T15	Vigna radiata	<i>insecticida</i>	Fabaceae	DEF 35	RTCMIKKEGWGKCLIDTTCAHSCKNRGYIGGNCKGMTRTCYCLVNC
SPE10_FABA	Q6B519	3PSM	Pachyrhizus erosus	<i>antimicrobiana</i>	Fabaceae	DEF 35	KTCENLADTFRGPCFTDGSCDDHCKNKEHLIKGRCDDFRCWCTRNC
HsAFP1_HEUSA	POC8Y5	2N2Q	Heuchera sanguinea	<i>F.culmorum, B.cinerea, F.oxysporum, P.digitatum, T.viride, L.maculans, S.tritici, V.albo-atrum, C.sphaerospermum, N. crassa</i>	Saxifragaceae	DEF 35	DGVKLCDVPSGTWSGHCGSSSKCSQQCKDREHFAYGGACHYQFPSVKCFCKRQC
Lc-DEF_LENCC	B3F051	2LJ7	Lens culinaris subsp.Culinaris	<i>A.niger</i>	Fabaceae	DEF 35	KTCENLSDSFKGPCIPDGNCKNHCKEKEHLLSGRCRDDFRCWCTRNC
RsAFP2_RAPSA	P30230	2N2R	Raphanus sativus	<i>N.crassa (acción sobre la síntesis de proteínas de membrana)</i>	Brassicaceae	DEF 35	QKLCQRPSGTWSGVCGNINNACKNQICIRLEKARHGSCNYVFAHKCICYFPC

PhD1_PETHY	Q8H6Q1	1N4N	Petunia Hybrida	<i>B.cinerea, F.oxysporum</i>	Solanaceae	10 cys	ATCKAECPTWDSVCINKKPCVACCKKAKFSDGHCSKILRRCLCTKEC
NaD1_NICAL	Q8GTM0	4AAZ y 4ABO	Nicotiana alata	<i>B.cinera, F.oxysporum, F.solani, H.annosum, E.coli and E.carotovora</i>	Solanaceae	DEF 35	RECKTESNTFPGICITKPPCRKACISEKFTDGHCSKILRRCLCTKPC
VrD2_VIGRA	Q8W434	2GL1	Vigna radiata	<i>antimicrobiana</i>	Fabaceae	DEF 35	KTCENLANTYRGPCFTTGSCDDHCKNKEHLRSGRCRDDFRWCWTRNC
PsDEF1_PINSY	A4L7R7	5NCE	Pinus sylvestris	<i>B.cinera, F.oxysporum, F.solani, H.annosum, E.coli, E.carotovora</i>	Pinaceae	DEF 35	RMCKTPSGKFKGYCVNNTNCKNVCRTEGFTGSCDFHVAGRKCYCYKPCP
DEF4_MEDTR	G7L736	2LR3	Medicago truncatula	<i>Permeabilización de membrana plasmática de F. graminearum</i>	Fabaceae	DEF 35	RTCESQSHKFKGPCASDHNCASVCQTERFSGGHCRGFRRCFCTTHC
AhPDF1_ARAHA	Q29SA6	2M8B	Arabidopsis halleri	<i>antimicrobiana</i>	Brassicaceae	DEF 32	RLCEKPSGTWSGVCNGNACRNQCIRLEKARHGSCNYVFAHKCICYFPC
NaD1_TOBAC	P32026	1MR4	Nicotiana tabacum	<i>antifungica</i>	Solanaceae	DEF 35	RECKTESNTFPGICITKPPCRKACISEKFTDGHCSKLLRRCLCTKPC
RS-AFP1_RAPSA	P69241	1AYJ	Raphanus sativus	<i>A.niger, A.versicolor, F.moniliforme, F.oxysporum, F.solani, N.crassa, S.cerevisiae, T.mentagrophytes</i>	Brassicaceae	DEF 35	QKLCERPSTWSGVCNNACKNQCNLEKARHGSCNYVFAHKCICYFPC
AlfAFP_MEDSA	Q9FPM3	nd	Medicago sativa	<i>A.solani, F.culmorum, P.infestans</i>	Fabaceae	DEF 35	RTCENLADKYRGPCFSGCDTHCTTKENAVSGRCRDDFRWCWTKRC
Fbatin1_VICFA	P81456	nd	Vicia faba	<i>Antibacteriano</i>	Fabaceae	DEF 32	LLGRCKVKSNRFHGPCLTDTHCSTVCRGEGYKGGDCHGLRRRCMCLC
Slalfa1_SORBI	P21925	nd	Sorghum bicolor	<i>Insecticida</i>	Poaceae	DEF 35	RVCRRRSAGFKGLCMSDHNCAQVCLQEGWGGGNC DG VIRQCKCIRQC
gama1Z_MAIZE	P81008	nd	Zea mays	<i>antifungica</i>	Poaceae	DEF 35	RVCRRRSAGFKGVCMSDHNCAQVCLQEGYGGGNC DG IMRQCKCIRQC
DEF1_WHEAT	P20158	1GPS	Triticum aestivum	<i>inhibidor de traducción de proteínas (probadas en celulas de ratón)</i>	Poaceae	DEF 35	KICRRRSAGFKGPCMSNKNCAQVCQEGWGGGNC DG PFRRCCKCIRQC
TPP3_SOLLC	Q40128	4UJO	Solanum lycopersicum	<i>Disrupción de membranas fúngicas por unión a fosfatidilinositol (PIP2)</i>	Solanaceae	DEF 35	QQICKAPSQTFFPLCFMDSSCRKYCIKEKFTGGHCSKLQRKCLCTKPCVFDKISSEVKAT LGEEAKTLEVVLEEEIMME
PDF1.2A_ARATH	Q9FI23	nd	Arabidopsis thaliana	<i>A.brassicicola</i>	Brassicaceae	DEF 35	QKLCERPSTWSGVCNSNACKNQCNLEGAHKGSCNYVFAHKCICYVPC

PDF2.2_ARATH	Q39182	nd	Arabidopsis thaliana	<i>antimicrobiana</i>	Brassicaceae	DEF 35	RTCESQSHRFKGTVCVSASNCANVCHNEGFVGGNCRGFRRRCFCTRHC
--------------	--------	----	-------------------------	-----------------------	--------------	--------	--

# Anexo 5

**Tabla A5.** Resumen de resultados obtenidos para todas las muestras analizadas: medidas espectrofotométricas y mínimas concentraciones inhibitorias (MIC). FT: fenoles totales, TH: taninos hidrolizables, TC: taninos condensados. C: corteza M: mortereado o maceración según el caso. 2 y 6: tiempos de extracción en hs. Ac: solvente agua, Et: solvente etanol, Me: solvente metanol. En negrita se indican las muestras seleccionadas en sección 3.2 P.a: *P.atropurpurascens*, P.ch: *P. chrysosporium*, G.t: *G. trabeum*, L.s: *L. sulphureus*.

Muestra	Medidas espectrofotométricas			Método de extracción	Solvente	MIC (mg/mL)					
	FT (mg GAE/g)	TH (mg TAE/g)	TC (mg CyaE/g)			P.a	P.ch	G.t	L.s		
<b>CM2Ac</b>	<b>132±40</b>	<b>78.3±18.9</b>	<b>14.8±8.4</b>	Mortereado	H <sub>2</sub> O	10	10	5	10		
DM2Ac	126±40	111.6±18.9	48.4±8.4			10	-	-	-		
AM2Ac	Nd	Nd	2.5±8.4			-	-	-	-		
CM6 Ac	133±40	103.9±18.9	25.1±8.4			-	5	-	-		
DM6Ac	233±40	216.6±18.9	72.4±8.4			-	-	2.5	-		
AM6Ac	nd	Nd	1.8±8.4			-	-	-	-		
CI2Ac	108±40	59.4±18.9	14.8±8.4	Infusión	H <sub>2</sub> O	10	2.5	2.5	10		
DI2Ac	206±40	84.6±18.9	29.3±8.4			-	5	-	5		
AI2Ac	Nd	Nd	Nd			-	-	-	-		
CI6Ac	106±40	102.2±18.9	12.8±8.4			-	-	10	-		
DI6Ac	84±40	232.6±18.9	18.8±8.4			-	-	10	-		
AI6Ac	Nd	Nd	Nd			-	-	-	-		
<b>CI2Et</b>	<b>280±40</b>	<b>184.1±18.9</b>	<b>41.1±8.4</b>			Infusión	ETOH	5	10	5	10
<b>DI2Et</b>	<b>380±40</b>	<b>301.6±18.9</b>	<b>79.2±8.4</b>					10	5	10	10
AI2Et	Nd	Nd	Nd					-	-	-	-
<b>CI6Et</b>	<b>398±40</b>	<b>260.9±18.9</b>	<b>54.2±8.4</b>					10	10	5	10
<b>DI6Et</b>	<b>443±40</b>	<b>334.4±18.9</b>	<b>85.0±8.4</b>	10	5			10	10		
AI6Et	55±40	9.6±18.9	Nd	-	-			-	-		
CM2Et	333±40	244.8±18.9	25.8±8.4	Maceración	MEOH	10	-	5	2.5		
DM2Et	285±40	45.8±18.9	22.4±8.4			10	-	10	10		
AM2Et	71±40	10.6±18.9	Nd			-	-	-	-		
<b>CI2Me</b>	<b>364±40</b>	<b>125.6±18.9</b>	<b>17.4±8.4</b>	Infusión	MEOH	5	10	5	10		
<b>DI2Me</b>	<b>333±40</b>	<b>321.4±18.9</b>	<b>56.5±8.4</b>			10	10	10	10		
AI2Me	18±40	5.1±18.9	8.5±8.4	-		-	-	-			
<b>CM2Me</b>	<b>397±40</b>	<b>273.6±18.9</b>	<b>58.1±8.4</b>	Maceración		10	10	5	10		
DM2Me	334±40	53.9±18.9	34.8±8.4			-	-	10	10		
AM2Me	Nd	11.4±18.9	Nd			-	-	-	-		
CM6Me	370±40	290.1±18.9	18.8±8.4			10	-	10	-		
DM6Me	333±40	282.9±18.9	26.9±8.4			-	-	-	10		
AM6Me	64±40	18.3±18.9	Nd			-	-	-	-		