



INFORME PERIODO 2014-2015

1. APELLIDO: Liggieri

Nombre(s): Constanza Silvina

Título(s): Lic. En Biología (Ecología). Dra. de la Facultad de Ciencias Exactas.

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

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría Profesional Asistente Mes: Septiembre Año: 2005

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

Mes: Mayo Año: 2010

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

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

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

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2010-2014

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

INSTITUCIÓN DE LA QUE DEPENDE LA UNIDAD DE EJECUCIÓN: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

ENTIDAD FINANCIADORA: Universidad Nacional de La Plata.

Financiamiento obtenido: Sí

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

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

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

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2014-2017

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

INSTITUCIÓN DE LA QUE DEPENDE LA UNIDAD DE EJECUCIÓN: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

ENTIDAD FINANCIADORA: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología, Presidencia de la Nación. Programa FONCYT (Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica).

3.3. Participación como colaboradora en Proyectos Acreditados de Investigación Científica

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

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2012-2015

UNIDAD DE EJECUCIÓN: Laboratorio de Bromatología.

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

ENTIDAD FINANCIADORA: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología, Presidencia de la Nación. Programa FONCYT (Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica). Resolución 141/13.

Financiamiento obtenido: Sí

NOMBRE DEL PROYECTO: “Aplicaciones biotecnológicas de enzimas hidrolíticas provenientes de la flora nativa.” Código: Proyecto X-682

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2014-2015

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

INSTITUCIÓN DE LA QUE DEPENDE LA UNIDAD DE EJECUCIÓN: Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

ENTIDAD FINANCIADORA: Universidad Nacional de La Plata. en el marco del Programa de Incentivos a la Investigación de la Secretaría de políticas Universitarias del Ministerio de Cultura y Educación.

Financiamiento obtenido: Sí

NOMBRE DEL PROYECTO: “Defensinas de flores de Asteraceae con potencial aplicación biotecnológica.” Código: Proyecto X-717

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 2014-2015

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

INSTITUCIÓN DE LA QUE DEPENDE LA UNIDAD DE EJECUCIÓN: : Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s): Caffini, Néstor Oscar

Cargo Institución: Ex-Investigador Principal CICPBA. Director del CIPROVE. Profesor Extraordinario Consulto. Fac. de Ciencias Exactas. U.N.L.P.

Dirección: Av. Caseros N° 506, 1° F, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. C.P: C1152AAO.

Tel: (011) 4307 8724. Dirección Electrónica: caffini@biol.unlp.edu.ar

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CiProVe). Cambio de Categoría de Laboratorio a Centro. Resolución del HCD de la Fac. de Ciencias Exactas de la UNLP (11° Reunión fecha: 29/05/14).

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

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

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

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre: Fac. de Ciencias Exactas. UNLP

Dependencia: Departamento de Ciencias Biológicas.

Dirección: Calles 47 y 115.

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

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

Especialidad: Biología

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

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

7.1. Especie *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae)

Del mismo modo que he informado en períodos anteriores, de esta especie se obtiene un extractivo enzimático en nuestro laboratorio, el cual es enviado periódicamente al Laboratorio de Bromatología perteneciente a la Universidad Nacional de San Luis (UNSL) ubicado en la ciudad de San Luis (Pcia de San Luis, Argentina). Dicho extracto es utilizado por los investigadores del citado laboratorio para ser probado en distintos tipos de ensayo. Como ejemplo de ellos se puede mencionar la utilización del extractivo como uno de los potenciales componentes de formulaciones de detergentes para lavandería por su contenido de proteasas alcalinas. En dicho laboratorio se encuentra trabajando la Prof. Dra. Sonia Barberis, quien forma parte del Grupo Responsable del PICT-2007-02224.

Actualmente la Dra. Barberis es directora de un PICT-2012-1129 (punto 3.3.), del cual la que suscribe forma parte del grupo colaborador. Es por ello, que el vínculo establecido con el Laboratorio de Bromatología, perteneciente al Instituto de Física Aplicada (INFAP) y dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)-Universidad Nacional de San Luis (UNSL), continúa vigente.

Por otra parte, tengo a cargo la co-dirección de la tesina de la Sta. Anabella Origone en conjunto con la dirección de la Dra. Sonia Barberis. Es por ello, que se prevé que la tesinista concorra al Ciprove para realizar ensayos de actividad inhibitoria de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina I) con las muestras obtenidas en su laboratorio. Sus muestras consisten en péptidos obtenidos por síntesis enzimática en medios orgánicos empleando a la especie *A. curassavica* como catalizador biológico. El objetivo que se busca con esta experiencia

en el Ciprove es ensayar si dichos péptidos pueden ser considerados bioactivos al poseer actividad antihipertensiva.

Explicaré brevemente lo que está a mi cargo de este proyecto de trabajo en conjunto como colaboradora.

Obtención de extractivos crudos, determinación de la actividad proteolítica y cuantificación del contenido de proteínas

Para la **obtención del extractivo enzimático** se parte del látex presente en esta especie, cuya colecta se realiza mediante incisiones superficiales de los pecíolos de las hojas de *A. curassavica*, logrando de este modo la exudación de un látex "lechoso" y de características semilíquidas. Se colecta en buffer cítrico-fosfato 0,1 M de pH 6,5 conteniendo 5 mM de EDTA y cisteína. El agregado de EDTA al medio se hace a fin de impedir la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo. En el caso de cisteína, la misma se adiciona debido a que permite mantener el medio reductor evitando de este modo la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas.

La suspensión obtenida primeramente se centrifuga a 16,000 x g por espacio de 30 minutos a 4°C con la finalidad de descartar gomas y otros materiales insolubles presentes. Luego, el sobrenadante es ultracentrifugado a 100.000 g durante 1 h a 4°C. Dicho sobrenadante, resultante de la ultracentrifugación contiendo las proteínas solubles, se llama *extracto crudo* (EC). El mismo fue fraccionado y conservado, congelado a -20°C o bien liofilizado, hasta el momento de ser procesado para estudios posteriores.

Con el fin de verificar que el extracto obtenido precedentemente, posee actividad enzimática, se realizó el **ensayo de actividad proteolítica** utilizando caseína como sustrato. Dicho ensayo asegura que la muestra presenta actividad enzimática, lo cual otorga al extracto, la capacidad de ser potencialmente viable para ser utilizado en las experiencias que se llevan a cabo en el Laboratorio de Bromatología de la ciudad de San Luis.

La mezcla de reacción contiene 0,1 ml de extracto crudo y 1,1 ml de caseína con cisteína 12 mM en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0. La reacción se lleva a cabo en baño termostático a 42°C, y se detiene 20 minutos después por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Cada tubo de ensayo luego fue centrifugado a 3.000 x g durante 30 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm¹.

¹ Arribére, M.C., Cortadi, A.A., Gattuso, M.A., Bettioli, M.P., Priolo, N.S., N.O. Caffini, (1998). "Comparison of *Asclepiadaceae* latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. cysteine peptidases". *Phytochem. Anal.* **9**: 267-273.

Para expresar la actividad enzimática se definió una unidad arbitraria a la que se llamó *unidad caseinolítica* (Ucas). Dicha unidad expresa la cantidad de proteasa que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones del ensayo².

En cuanto a la **determinación del contenido de proteínas** también se utilizó, al igual que en las otras especies estudiadas, el método de Bradford³.

7.2. Especie *Maclura pomifera* (Fam Moraceae)

En referencia a esta muestra colaboré en la búsqueda de actividades biológicas de lactosuero y soja utilizando los hidrolizados proteicos de cada uno de estos sustratos empleando fitoproteasas pertenecientes a esta especie. Es así que se investigó si dichos hidrolizados poseen actividad antioxidante y/o actividad inhibitoria de la ECA.

7.2.1. Determinación de la actividad antioxidante mediante la formación del radical ABTS* en los hidrolizados obtenidos de lactosuero y soja como sustratos proteicos

Para determinar la actividad antioxidante de las muestras a ensayar durante este periodo se ha seguido la técnica de Kumaraswamy & Satish⁴ con modificaciones. En el informe correspondiente al año 2012-2013 se ha probado otras técnicas para la determinación de la actividad antioxidante como la técnica del DPPH⁵ y el método de la inhibición de la decoloración del β -caroteno⁶.

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

² Priolo, N., Morcelle del Valle, S., Arribère, M.C., López, L.M.I., Caffini, N. (2000). "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.* **19**: 39-49.

³ Bradford, M. B. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**(1-2), 248-254.

⁴ Kumaraswamy MV, Satish S: Antioxidant and anti-lipoxygenase activity of *Thespesia lampas* Dalz & Gibs. *Adv Biol Res* 2008; **2**:56-59.

⁵ Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park, S.H. & Kim, S.K. (2002). "Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison", *Plant Science*, **163**:1161-1168.

⁶ Tepe, B.; Sokmen, M.; Akpulat, H.A. & Sokmen, A. (2005). "In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey", *Food Chemistry*, **92**: 89-92.

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

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

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

Luego de obtener de forma adecuada cada uno de los hidrolizados, con sus correspondientes tiempos de hidrólisis (30, 90 y 180 minutos), provenientes del lactosuero y de la soja se obtuvieron los siguientes resultados de actividad antioxidante:

Sustrato	Porcentaje de inhibición del ABTS ⁺
Lactosuero	0.433 ± 0.000; 0.414 ± 0.046; 0.492 ± 0.010 (30, 90 y 180 minutos, respectivamente)
Soja	32% (30,90 y 180 minutos)

7.2.2. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA

La enzima convertora de angiotensina I (ECA) es un tipo de metalocarboxipeptidasa. La actividad inhibitoria de esta enzima in vitro fue medida utilizando el sustrato fluorogénico Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH⁷.

Se emplearon muestras de los hidrolizados proteicos provenientes de lactosuero y caseína empleando a las proteasas de esta especie, para verificar la presencia de péptidos que inhiban esta enzima. La actividad inhibitoria de estas muestras fue determinada incubando 3 µl de ECA con 2 µl de una solución de sustrato en DMSO (0,5mg/ml) en presencia de 25 µl de muestra y llevando a un volumen final de 3 ml en una cubeta de cuarzo con buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, conteniendo NaCl 50 mM y Cl₂Zn 10 µM a 37 °C. La reacción se llevó a cabo utilizando un espectrofluorómetro RF-1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) registrando el incremento de la fluorescencia (λ_{ex} = 320 nm, λ_{em} = 420 nm) durante 3 minutos. Como control positivo de inhibición se utilizó un stock de Captopril (1 mM en agua), inhibidor sintético de ECA. Los

⁷ Carmona AK, Schwager SL, Juliano MA, Juliano L, Sturrock ED. 2006. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. Nature protocols, 1(4), 1971-6. doi:10.1038/nprot.2006.306

datos fueron expresados en porcentajes de inhibición (un resultado de 0% corresponde a la mezcla de reacción sin el inhibidor). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

También se calculó la IC₅₀, cuyo valor corresponde a la concentración de muestra que logra inhibir la ECA en un 50%.

Muestra	Porcentaje de inhibición de la ECA	IC ₅₀
Lactosuero	21 ± 1 %,	16 mg/ml
Lactosuero concentrado (5 veces)	41 ± 3 %)	No medible
Caseína	91,2 ± 0,3 % (180 min) *	2,6 ± 0,3 mg/ml
	86,4 ± 0,2 % (60 min) *	4,8 ± 0,4 mg/ml

*Los tiempos de hidrólisis en donde se registraron los mayores valores de porcentaje de inhibición de la ECA

7.3. Especie *Artium minus* (Fam Asteraceae)

Se continuó con el estudio de esta muestra cuyos objetivos fueron la evaluación de la actividad antioxidante utilizando el método de la inhibición de la decoloración del β-caroteno⁸. y el grado de hidrólisis de los hidrolizados provenientes del lactosuero empleando a las proteasas de esta especie como catalizadores biológicos.

7.3.1. Determinación de la actividad antioxidante por el método de inhibición de la decoloración del β-caroteno

Para la preparación del reactivo, primeramente se disuelven 0.8 mg de β-caroteno en 4 ml de cloroformo. Posteriormente se agregan 80 mg de ácido linoleico y 800 mg de Tween 20. El cloroformo fue completamente evaporado a 40 °C. Subsiguientemente se agrega 200 ml de agua destilada saturada en oxígeno. Así, la mezcla de reacción es realiza como sigue: 2,5 ml del reactivo y 0,1 ml de muestra. Se utiliza como control negativo agua destilada y como control positivo una curva estándar de ácido ascórbico (rango de concentración 0.1–0.00001 g/mL). Esta mezcla de reacción fue incubada durante 120 minutos a 50 °C. El seguimiento se realiza registrando la absorbancia a 470 nm a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos de reacción. El porcentaje de actividad oxidante se determina por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de actividad oxidante} = \text{valor de absorbancia (tiempo final)} / \text{valor de absorbancia (tiempo final)} \times 100.$$

⁸ Tepe, B.; Sokmen, M.; Akpulat, H.A. & Sokmen, A. (2005). "In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five Allium species from Turkey", Food Chemistry, 92: 89-92.

Las muestras que fueron evaluadas con este método corresponden al producto de hidrólisis del lactosuero que se obtuvo luego de 5 hr de reacción. Dicho hidrolizado fue ultrafiltrado (membrana de tamaño de corte de 3kD) y posteriormente sometido a una cromatografía líquida de alta performance en fase reversa (RP-HPLC) dando un perfil cromatográfico con nueve picos. A cada uno de estos picos se le ensayó la actividad antioxidante.

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla:

Picos del perfil de RP-HPLC*	Actividad Antioxidante	Acido Ascórbico [gr/ml]
3.44	50.7 ± 0.1	0.52 ± 0.01±
4.10	74.1 ± 0.5	0.87 ± 0.01
4.54	79.3 ± 1.0	0.94 ± 0.01
5.53	79.3 ± 1.0	0.16 ± 0.02
20.15	9.7 ± 0.2	Indetectable
21.6	15.6 ± 0.4	Indetectable
23.67	12.8 ± 0.5	Indetectable
26.23	15.0 ± 0.4	Indetectable
26.98	4.4 ± 1.1	Indetectable

- *Tiempos de retención

7.3.2. Determinación del grado de hidrólisis. Método del TNBS

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

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

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

Para la determinación del GH se analizó la concentración de grupos aminos libres con el método del ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS)⁹, Se mezclaron 0,04 ml de las muestras (hidrolizados y el lactosuero como control negativo, por separado) con 0,32 ml de buffer fosfato 0,2125 M, conteniendo 1% SDS, pH 8,2 y 0,32 ml de una solución al 1% del ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS). Los tubos se incubaron a 50°C durante 1 hora al resguardo de la luz, y luego se detuvo la reacción con 0,64 ml de HCl 0,1N. Se dejó enfriar

⁹ Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(6), 1256-62.

los tubos en oscuridad durante aproximadamente 60 minutos y finalmente se leyó la absorbancia a 340 nm. Se utilizó leucina como patrón para la construcción de la curva de calibración, con concentraciones 0,225; 0,450; 0,90; 1,125 y 2,25 mM a partir de una solución stock de 4,5 mM. Las diluciones se efectuaron con el mismo buffer fosfato con SDS al 1%. Tanto las determinaciones de los puntos de la curva patrón como las de las muestras analizadas se realizaron por triplicado.

El grado de hidrólisis fue calculado con la siguiente aproximación:

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

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

Las muestras que fueron evaluadas con este método corresponden a los productos de hidrólisis del lactosuero que se obtuvieron luego de 3 y de 5 hr de reacción, siendo sus resultados 2.4 –0.4% y 5.6 –0.5%, respectivamente.

7.4. Evaluación de la actividad antioxidante de los productos de hidrólisis utilizando lactosuero bovino como sustrato y a las fitoproteasas provenientes de las especies *Asclepias curassavica*, *Maclura pomifera*, y *Bromelia hieronymi*.

En el lactosuero se encuentran proteínas que son precursoras de diferentes péptidos biológicamente activos como aquellos que poseen actividad antioxidante. Dichos péptidos son inactivos en su secuencia original por lo cual necesitan ser hidrolizados para que se liberen las secuencias biológicamente activas. Estas hidrólisis son llevadas a cabo por diferentes enzimas entre las que se encuentran aquellas provenientes de las especies vegetales ya nombradas precedentemente.

7.4.1. Preparación del sustrato

Se utilizó quimosina comercial (50 IMCU / ml) para el proceso de coagulación de la leche bovina y así obtener el lactosuero. La actividad específica¹⁰ de esta enzima fue de 5,894 ±0,004 mg/ml

7.4.2. Obtención de los extractos enzimáticos

- *Maclura pomifera*

Por medio de cortes superficiales se colectó el látex de frutos maduros de *M. pomifera* sobre buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,6 conteniendo EDTA 5mM como protector. La suspensión fue

¹⁰ Priolo, N., Morcelle del Valle, S., Arribére, M.C., López, L.M.I., Caffini, N. (2000). "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.* **19**:39-49.

centrifugada a 4 °C y 16000 g durante 20 minutos, descartando así los materiales insolubles presentes. Este extracto y fue parcialmente purificado por precipitación etanólica fraccionada. Posteriormente el precipitado proteico obtenido fue resuspendido en el mismo buffer de partida y esta suspensión parcialmente purificada fue denominada PER (precipitado etanólico redissuelto). El PER fue empleado para hidrolizar proteínas del lactosuero y realizar los ensayos de actividad antioxidante.

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford³:

-Bromelia hieronymi

El extracto enzimático fue obtenido colectando los frutos, los cuales fueron cortados y homogeneizados en un mezclador con 250 ml de buffer fosfato de sodio 0,1 mol frío (pH 6,0; 5 mmol EDTA y 5 mmol / L cisteína). Posteriormente este homogenato fue filtrado para la eliminación de los residuos groseros del fruto y centrifugado durante 30 minutos a 16000 g. Se colectaron los sobrenadantes, previamente filtrados y se reservaron a -20 °C. Los hidratos de carbono solubles y pigmento fueron eliminados precipitándolos con cuatro volúmenes de etanol frío con agitación suave durante 20 minutos y luego fue centrifugado a 16.000 g durante 20 min.

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford³.

-Asclepias curassavica

Ver apartado 7.1.

A cada uno de los extractivos se les determinó la actividad específica. Los valores de dicha actividad para *M. pomífera*, *B. hieronymi* y *A. curassavica* fueron, $4,0 \pm 0,117$; $13,6 \pm 1,7$ y $4,2 \pm 0,117$ Ucas/mg, respectivamente.

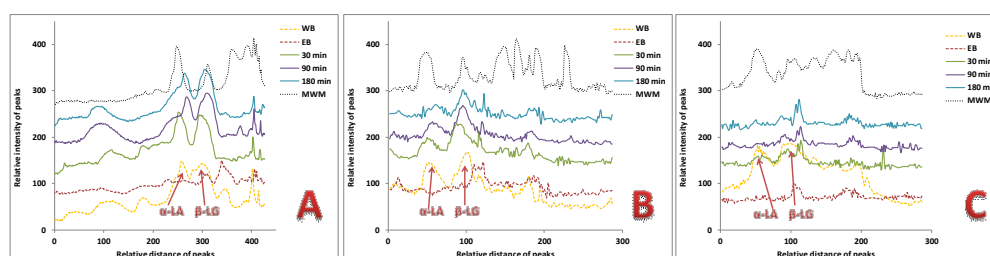
7.4.3. Reacción de Hidrólisis

La relación que se utilizó para las reacciones de hidrólisis con las proteasas de las especies *Asclepias curassavica*, *Maclura pomifera*, y *Bromelia hieronymi* fue de 1 parte de enzima por 9 partes de sustrato (1:9). El ensayo se realizó a una temperatura de 45 °C y se sacaron muestras a 0, 30 y 180 minutos. Como controles se emplearon el blanco de enzima (1:9 agua destilada:sustrato) y el blanco del sustrato (1:9 agua destilada: sustrato).

7.4.4. Seguimiento de la reacción de hidrólisis

Se realizaron electroforesis de SDS-PAGE-Tricina¹¹ y se determinaron los grados de hidrólisis de los respectivos hidrolizados por el método del TNBS⁹ (ver apartado 7.3.2.).

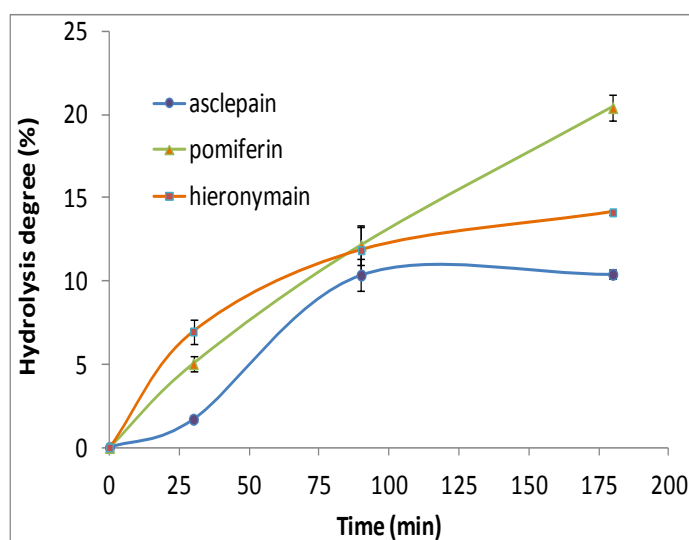
En la siguiente figura se observan los perfiles de los densitogramas obtenidos de las electroforesis. Los perfiles A, B y C corresponden, respectivamente a los hidrolizados de lactosuero provenientes de *A. curassavica*; *M.pomidera* y *B. hieronymi*. Por otro lado, WB indica el blanco del sustrato y EB corresponde al blanco de la enzima y 30, 90 y 180 minutos son los tiempos de hidrólisis. Del mismo modo, (α -LA) y (β -LG), corresponde respectivamente a la α -lactoalbumina y β -lactoglobulina.



De esta figura se desprende que los perfiles de los péptidos de degradación fueron concordantes a las actividades específicas de los tres extractivos enzimáticos. Se aprecia que las bandas principales de las proteínas del lactosuero, α -lactoalbúmina (α -LA) y β -lactoglobulina (β -LG), fueron significativamente degradada por las proteasas de la especie *B. hieronymi*, mientras que las correspondientes a *M. pomifera* han degradado principalmente a la α -LA y finalmente las enzimas de *A. curassavica* han hidrolizado débilmente ambas proteínas de suero de leche.

¹¹ Pardo, M. F., & Natalucci, C. L. (2002). Electrophoretic analysis (Tricine-SDS-PAGE) of bovine caseins. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21(1), 57-60.

La siguiente figura representa los resultados obtenidos luego de evaluar el grado de hidrólisis.



En ella se puede observar que a pesar de los perfiles de SDS-PAGE, el hidrolizado proveniente del extractivo de *B. pomifera* resultó ser el que presentó el mayor valor ($20,4 \pm 0,8\%$), mientras que los correspondientes a *B. hiernymi* y *A. curassavica* fueron menores $14,1 \pm 0,1$ y $10,4 \pm 0,3\%$, respectivamente.

7.4.5. Determinación de la actividad antioxidante en los hidrolizados proteicos

Esta evaluación se realizó por medio del método del ABTS (ver apartado 7.2.1.).

Se estimó, además, el parámetro IC_{50} (concentración de la muestra requerida para obtener un valor de 50% de la actividad oxidante) utilizando como controles positivos el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromanocarboxílico) y el BHT (Butil hidroxitolueno).

En la siguiente Tabla se puede observar los porcentajes de actividad antioxidante que han presentado los hidrolizados obtenidos de las tres especies ensayadas.

	Hidrolizado <i>A. curassavica</i>	Hidrolizado <i>M. pomifera</i>	Hidrolizado <i>B. hieronymi</i>
% Actividad Antioxidante	$41,6 \pm 2,47$	$22,9 \pm 1,27$	NSD*

*No existe diferencia significativa con el blanco de reacción

De esta tabla se concluye que la actividad antioxidante máxima se detectó en hidrolizados de 180 minutos obtenidos con *A. curassavica* ($41,6 \pm 2,47\%$). Este valor fue casi el doble al correspondiente al extracto enzimático de *M. pomifera* ($22,9 \pm 1,27\%$); mientras

que no se encontraron diferencias significativas con el control negativo para hidrolizado preparado con *B. hieronymi*.

Los resultados obtenidos de la evaluación del parámetro IC₅₀ se aprecian en la siguiente tabla.

	Valor de IC ₅₀ (mg/ml)
Hidrolizado de 180 min con la especie <i>A. curassavica</i>	1,479±0,202
Hidrolizado de 180 min con la especie <i>M. pomifera</i>	4,443±0,435
BHT	0,182±0,035
TROLOX	0,312±0,019

Por lo tanto se puede concluir que el hidrolizado de 180 minutos preparado con *A. curassavica*, mostró la mejor capacidad mejor antioxidante. De este modo, los péptidos antioxidantes liberados a partir de proteínas de suero de leche por las especies *A. curassavica* y *M. pomifera* tendrían un uso potencial en el desarrollo de antioxidantes naturales para las industrias alimentaria y farmacéutica.

7.5 Colaboración en ensayos de laboratorio para el grupo de trabajo que dirige la Dra. Sandra Vairo Cavalli

En la siguiente lista se mencionan algunas de las técnicas realizadas

- Purificación cromatográfica de *Silybum marianum* (exclusión molecular, intercambio iónico).
- Actividad coagulante de leche de proteasas aspárticas.
- Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) discontinua en condiciones reductoras.
- Western blot.
- Preparación de diferentes medios de cultivo
- Crecimiento y mantenimiento de cultivos bacterianos.
- Preparación de células competentes.
- Transformación por shock térmico de las bacterias competentes químicas.
- Extracción de ADN plasmídico de bacterias por lisis alcalina o por empleo de del kit comercial *AccuPrep Plasmid MiniPrep DNA Extraction Kit* (Bioneer).
- Extracciones de ARN total de las especies estudiadas.

7.6. Determinación de actividad antioxidante de muestras de leche de cabra alimentadas con una dieta a base de orujo (Servicio realizado para la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP)

Todos los lotes de leche fueron pasteurizados por calentamiento a 62°C durante 30 min inmediatamente después de ingresar al laboratorio.

Se realizaron ensayos de determinación de poder reductor según la técnica de Li *et al.*¹² con una curva de cisteína como standard, y de actividad antioxidante por dos métodos diferentes: aclaramiento del radical estable DPPH (Choiet *et al.*,¹³ y aclaramiento del radical catiónico ABTS (Re *et al.*,¹⁴, con curvas standard de BHT y trolox, respectivamente. Estas técnicas son colorimétricas y las determinaciones de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro Agilent 8453E.

Los datos fueron procesados mediante el uso de las planillas de cálculo de Excel 2007 (Microsoft) para aproximaciones lineales y Sigma Plot 10.0 (Systat Software Inc.) para las regresiones no lineales. Se analizó la presencia de diferencias significativas entre los valores de absorbancia de las distintas muestras por análisis de varianza (ANOVA), seguido de la comparación de pares de datos por medio del test de Tukey (GraphPadPrism 5.0, GraphPad Software, Inc).

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1. PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

-Trabajos publicados

Cimino, C. V., Colombo, M. L., Liggieri, C., Bruno, M., & Vairo-Cavalli, S. (2015). Partial Molecular Characterization of *Arctium minus* Aspartylendopeptidase and Preparation of Bioactive Peptides by Whey Protein Hydrolysis. *Journal of medicinal food*. ISSN: 1096-620X (impreso), 1557-7600 (electrónico) disponible online <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2014.0101>.

¹²Li G., Cook M.E. & Wu W. (1996) "Reduction of Ferricyanide by Thiamine or Thiamine Pyrophosphate" *Biochem. Biophys. Res. Communications* **226**:187-192

¹³Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Y., Park S.H. & Kim S.K. (2002) "Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison" *Plant Sci.*, **163**:1161-1168.

¹⁴Re R., Pellegrini A., Proteggente A., Pannala M., Yang C. & Rice-Evans C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radic. Biol. Med.* **26**:1231-1237.

Juan I. Bertucci, Constanza S. Liggieri, María Laura Colombo, Sandra E. Vairo Cavalli and Mariela A. Bruno. "Detection of antioxidant and inhibitory angiotensin converting enzyme (ACE) biopeptides on whey protein hydrolysates prepared employing peptidases from *Maclura pomífera*". *LWT - Food Science and Technology*.64 (2015) 157-163. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.05.041. ISSN 0023-6438.

8.1.2. COMUNICACIONES A REUNIONES CIENTÍFICAS

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

8.1.2.2 Reyes Jara, Andrea; Liggieri, Constanza; Bruno, Mariela. "Employ of *Maclura pomifera* serine proteases in preparation of soy hydrolysates containing antioxidant peptides". VII Workshop on Biocatalysis and Biotrasformations. I Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones. Búzios, Brasil. 23 al 26 de septiembre de 2014. Póster nro 37, presentado el 24/09/2014.

8.1.2.3. Liggieri, Constanza; Vairo Cavalli, Sandra; Colombo, María Laura; Fernandez Agustina. "Defensinas de flores de Asteraceae con potencial aplicación biotecnológica". V Jornada de Ciencia y Tecnología en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. 12, 13 y 14 de noviembre 2014.

8.1.2.4. Colombo M.L, Cimino CV, Liggieri CS, Bruno M.A., VairoCavalli S. "Cloning and molecular characterization of cDNA encoding plant aspartic proteases with milk clotting activity from *Cynara scolymus* and *Arctium minus*". V. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014). Córdoba, Argentina. 17 a 18 de Noviembre de 2014.

8.1.2.5. Liggieri C., Colombo M.L., Bruno MA. "Preparation of whey hydrolysates containing antioxidant peptides using plant peptidases from three different species". V. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014). Córdoba, Argentina. 17 a 18 de Noviembre de 2014. Póster BP-9. ISBN 978-987-45738-5-8.

- 8.1.2.6. Anabella Origone, Constanza Liggieri, Sonia Barberis. “Determinación de la actividad endoesterolítica del extracto proteolítico de *Asclepias curassavica* L. XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Abstract N° 145 del Acta del Congreso y en revista Biocell (aún no publicado). Municipalidad de Estancia Grande, San Luis, Argentina. 5 de Diciembre de 2014.
- 8.1.2.7. Anabella Origone, Constanza Liggieri, Héctor Sturniolo y Sonia Barberis. “Síntesis de péptidos bioactivos de interés para la industria alimenticia, utilizando nuevas fitoproteasas”. XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Abstract N° 146 del Acta del Congreso y en revista Biocell (aún no publicado). Municipalidad de Estancia Grande, San Luis, Argentina. 5 de Diciembre de 2014.

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

TAREA DOCENTE DE GRADO

CARGO: Jefe de Trabajos Prácticos

Se continuó con la modalidad implementada en el año 2012, tal como fue informado en los periodos anteriores. La *clase taller* fue la modalidad adoptada en la cátedra para que se lleven a cabo los procesos de enseñanza y aprendizaje con el objeto que los alumnos alcancen el conocimiento significativo crítico. El fundamento de esta modalidad es principalmente, la construcción de conocimiento a partir de las ideas previas que cada uno de los alumnos puede aportar a la discusión global de los contenidos curriculares. El disparador de cada clase fue un texto de trabajo o consigna sobre los contenidos correspondientes a cada clase en particular. Los docentes, a cargo de la misma, desarrollaron más profundamente los contenidos conceptuales a lo largo de las horas de discusión. En cuanto a la *Evaluación* se mantuvo un esquema de dos evaluaciones parciales, correspondientes a dos partes de la cursada. El contenido y modalidad de las evaluaciones fueron acordes a la modalidad de ejercitación y discusión de conceptos realizados durante las clases.

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

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

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

Autorizada la inscripción para la realización de la misma por la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Resolución N° 1743. Autorizada la inscripción para la realización de la misma por la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Resolución N° 1743. Carga horaria total de cuatrocientas cuarenta y ocho (448) horas reloj.

Finalización de las Cursadas de las Asignaturas que integran la Carrera¹⁵

- A) **Diseño y Coordinación de los Procesos Formativos**. Docente: Mg. Mónica Ross. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre. 2012. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 3-10-2012
- B) **Problemática de la Enseñanza en Campos. Disciplinarios Específicos - Ciencias Naturales**. Docente: Dra. Graciela Merino. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre, 2012. Aprobado: 10 (diez). Fecha: 08-11-2012
- C) **Pedagogía y Universidad**. Docente: Prof. Daniel Suarez. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre, año 2012. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 24/04/2013.
- D) **Perspectivas sociopolíticas del sistema universitario**.
Docentes: R. Marengo y C. Caminos Lagorio. Obligatorio. Primer cuatrimestre, año 2013. Aprobado: 7 (siete). Fecha: 12/08/2013.
- E) **Desarrollo e innovación curricular**. Docentes. R. Coscarelli y G. Hernando. Obligatorio. Primer Cuatrimestre, año 2013. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 15/08/2013.
- F) **Procesos de Evaluación en la Educación Superior**. Docente: Sonia Araujo. Electivo. Primer Cuatrimestre año 2013. Aprobado: 10 (diez). Fecha: 09/09/2013.
- G) **Prácticas de Intervención académica**. Docente: Mónica Paso. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre año 2013. Aprobado: 9 (nueve). Fecha: 03/02/2014.
- H) **Taller de Producción del Trabajo Final de la Especialización**. Docentes: Santos y Catino. Obligatorio. Segundo Cuatrimestre año 2013. Aprobado: 8 (ocho). Fecha 10/11/2013.
- I) **Taller Investigación e intervención en la práctica docente universitaria**". Docente: Gloria E. Edelstein. Obligatorio. Primer cuatrimestre año 2014. Aprobado: 9 (nueve).. Fecha 10z/06/2014

¹⁵ Título del Trabajo Final: *Planificación de la implementación de estrategias de enseñanza innovadoras de los contenidos curriculares de la asignatura Biología perteneciente al tercer y cuarto cuatrimestre del CIBEX*. Actualmente en proceso de evaluación para su aprobación.

J) **Taller de Escritura de Textos Académicos.** Docente: Guillermina Piatti. Optativo. Primer cuatrimestre año 2014. Aprobado: 9 (nueve). Fecha 02/10/2014.

K) **Seminario Optativo Específico por Equivalencia** “*Hidrología de humedales y su relación con las aguas subterráneas*”. Dictado por la Dra. Eleonora Carol. Organizado por el Departamento de Postgrado de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (U.N.L.P.). Duración: 40 hs. Con Evaluación final aprobada. Fecha 04/03/2015.

Nota: Actualmente el anteproyecto del Trabajo Final Integrador (TIF) está en proceso de evaluación.

10.2. PARTICIPACIÓN EN LA CO-DIRECCIÓN DE TESINA

Tesinista: Sta. Anabella Origone. Alumna de la Carrera de Ingeniería de Alimentos. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. Argentina.
Título del Trabajo: *Síntesis de péptidos antimicrobianos de interés para la industria alimenticia, utilizando nuevas fitoproteasas.* (Resolución 051-14; Fecha: 20/02/14).

10.3. MIEMBRO DE JURADO PARA EVALUACIÓN DE TRABAJO FINAL DE LICENCIATURA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS (UNLP)

Integrante del Jurado para evaluar el Trabajo Final de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la alumna María Eugenia Simurro realizado bajo la Dirección del Dr Balatti, Pedro y la Co-Dirección de la Dra. Toledo, Andrea.

Título del Trabajo Final: “*Estudio del efecto nutricional en el desarrollo y la virulencia de Beauveria bassiana (Hypocreales: Cordycipitaceae). Evaluación de su potencial biocida sobre Dalbulus maidis (Hemiptera: Cicadellidae), vector de patógenos del maíz*”. Octubre 2014.

10.4. REFERATO DE TRABAJOS CIENTIFICOS

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

10.4.2. Referato del manuscrito PRBI-D-15-00350 (2015). *Process Biochemistry (PRBI)*. ISSN, 1359-5113.

10.5. MIEMBRO DE LA COMISIÓN PARA LA EVALUACIÓN DE PROYECTOS DE EXTENSIÓN DE LA UNLP.

Convocatoria 2014

10.5.1. ÁREA: Ambiente, Urbanismo y Patrimonio

Proyecto: Isla Paulino. Salvaguarda del patrimonio arquitectónico y sociocultural.

10.5.2. ÁREA: Ambiente, Urbanismo y Patrimonio

Proyecto: Manos de tierra. Recuperando saberes, mejorando el hábitat comunitario

10.5.3. ÁREA: Ambiente, Urbanismo y Patrimonio

Proyecto: Plaguicidas: los condimentos no declarados

10.5.4. ÁREA: Ambiente, Urbanismo y Patrimonio

Proyecto: Acción Extensionista. Revalorización patrimonial –turística del cementerio platense.

Puesta en valor del cementerio de La Plata con fines turísticos.

10.6. PARTICIPACIÓN EN LA CO-DIRECCIÓN DE PASANTES DE LABORATORIO

-Carolina de Araújo Viana. Becaria Doctoral. En el marco del Programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Nivel Superior (CAPES) de Brasil. Proyecto: “Investigación Bioquímica y Prospección Biotecnológica de Proteasas Vegetales”. Agosto de 2014.

-Idila María Da Silva Araujo. Becaria de Postgrado. En el marco del Programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Nivel Superior (CAPES) de Brasil. Proyecto: “Investigación Bioquímica y Prospección Biotecnológica de Proteasas Vegetales”. Noviembre-Diciembre de 2014.

10.7. JORNADA DE CAPACITACIÓN PARA EL PROCESO DE EVALUACIÓN DE PROYECTOS DE EXTENSIÓN

2014 (7 de Octubre). **Taller para la Construcción de Criterios de Evaluación de Proyecto de Extensión. Convocatoria 2014.** Responsable: Leandro Quiroga. Secretario de Extensión Universitaria de la Universidad Nacional de La Plata. Asistencia. Duración 5 horas.

10.8. GESTIÓN ADMINISTRATIVA Y CONTABLE DE LABORATORIO

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