



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral



Título
**“Estudio Bioquímico y Biológico
de nuevos Extractos Proteicos
de Plantas Alimentarias:
Potencial aplicación como Agentes
Anticoagulantes, Hipoglucemiantes,
Antioxidantes y Anti-infectivos naturales”**

Tesista Bioq. Santiago Pablo Claver

Director Dr. Walter David Obregón

Codirector Dr. Juan Abreu Payrol

Año 2023

Agradecimientos y dedicatorias.

Este trabajo doctoral es el resultado de varios esfuerzos compartidos, algunos directos y otros indirectos.

No existiría esta tesis sin el empeño directo, la mirada optimista, permanente, rigurosa y detallista de David. Tampoco podría ser posible sin el apoyo, la amabilidad y generosidad de Juliana ni la paciencia, el trabajo y los esfuerzos de Brenda. Así como la predisposición constante y generosa de Mónica, y la participación fundamental en momentos críticos de Juan, nuestro querido hermano cubano. A todos ellos mi más sentido agradecimiento por tanto tiempo y paciencia.

Agradecer a Nora Priolo y Néstor Caffini, por hacerme sentir en mi casa por primera vez en el viejo LIProVe, en un ambiente muy afectivo, contenedor y formativo, allá por el año 1999. Dicho sentido de pertenencia fue el que me incentivó a continuar en una carrera que me resultaba muy difícil; y que, visto a la distancia, fue semilla para generar los vínculos que propiciaron posteriormente esta tesis.

Agradecer a mi familia, por siempre creer en mí, por incentivarme y no dejarme abandonar cuando ya no me quedaban más fuerzas. Gracias a mi hijo Milo por ser siempre paciente, por cederme tanto tiempo juntos, entendiendo que esta tesis es muy importante en mi desarrollo personal. A mis padres, Haydée B. Maldonado y Omar J. Claver, por creer incondicionalmente en mí, sin ellos no podría haber llegado, en primer lugar, al título de Bioquímico. Y a Belén, por sostener toda mi estructura estable en el hogar. A Julieta por sostenerme desde un amor gigante y una oreja paciente.

Agradecer a dos personas que aparecieron en el camino, para líneas de la tesis que finalmente, y pandemia mediante, no pudimos terminar de incorporar. Pero si prevalece el vínculo y me han aportado mucho tiempo y conocimiento, la Dra Carolina Entrocassi y el Dr Marcelo Ferrepín. Confío en que a futuro podremos concretar nuevos proyectos.

Agradecer a todo el equipo de técnicas y secretarias del Laboratorio Vitalis, que comprendieron perfectamente cada momento en los que tuve que ausentarme, multiplicando sus responsabilidades y esfuerzos.

Agradecer el tiempo y voluntad de Marianela, para volver más bella la edición de esta tesis.

Como suele ocurrir en un trabajo como este, de tantos años, tantos contratiempos y esfuerzo, en esta hora puedo olvidar o no mencionar a varios, muchos tal vez, que me acompañaron en momentos puntuales, que me incentivaron cuando decaí, que aportaron algo cuando hizo falta: por favor, no me tilden de mal agradecido o se sientan excluidos de estos agradecimientos, con seguridad cuando la vida nos vuelva a colocar en proximidad sentirán en cercanía cuanto les agradezco y los aprecio. Un fuerte abrazo a todos.

Por último, sumar el recuerdo permanente y cotidiano de mi abuelo Antonio E. Claver, y de mi abuela Lía Ester Zapico, que en su amor me siento acompañado día a día.

Trabajos publicados en el marco de esta tesis

1. Cotabarren, J.; Ozón, B.; Claver, S.; Garcia-Pardo, J.; Obregón, W.D. Purification and Identification of Novel Antioxidant Peptides Isolated from *Geoffroea decorticans* Seeds with Anticoagulant Activity. *Pharmaceutics* 2021, 13, 1153. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081153>. Impact Factor 6.31.
2. Cotabarren, J.; Claver, S.; Payrol, J.A.; Garcia-Pardo, J.; Obregón, W.D. "Purification and Characterization of a Novel Thermostable Papain Inhibitor from *Moringa oleifera* with Antimicrobial and Anticoagulant Properties". *Pharmaceutics* 2021, 13, 512. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040512>. Impact Factor 6.31.
3. Juliana Cotabarren, Daiana Judith Broitman, Evelina Quiroga, Walter David Obregón. GdTI, the first thermostable trypsin inhibitor from *Geoffroea decorticans* seeds. A novel natural drug with potential application in biomedicine. Corresponding author. *International Journal of Biological Macromolecules*. 5-Year Impact Factor: 4.784. online 22/01/2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.214> Volume 148, 1 April 2020, Páginas 869-879.
4. Cotabarren J, Ozón B, Claver S, Geier F, Rossotti M, Garcia-Pardo J, Obregón WD. A Multifunctional Trypsin Protease Inhibitor from Yellow Bell Pepper Seeds: Uncovering Its Dual Antifungal and Hypoglycemic Properties. *Pharmaceutics*.2023;15(3):781.<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030781>. Impact Factor 6.31.

Breve resumen general y estructural de la tesis.

El trabajo de tesis doctoral se organiza en 3 partes principales.

La primera parte incluye al **capítulo 1**, que contiene una introducción general de todos los conceptos generales y antecedentes de los temas a desarrollar. Luego, el **capítulo 2** se basa en la extracción y producción de 16 **extractos proteicos vegetales (EPVs)** a partir de fuentes vegetales de consumo humano. Los EPVs son caracterizados bioquímicamente mediante la determinación de su concentración proteica; su estabilidad térmica, la inhibición de proteasas de interés biotecnológico, el estudio de actividades biológicas de interés biomédico, tales como la actividad antioxidante e hipoglucemiante, etc. Además, los EPVS fueron estudiados para la búsqueda de propiedades antimicrobianas, debido a la gran cantidad de reportes referidos a estas actividades en los últimos años. Se utilizan para el estudio sistemas bacterianos y fúngicos. Las bacterias patógenas ensayadas fueron: GRAM positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) y GRAM negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*). Para la actividad antifúngica se utilizaron como modelos de especies del género *Cándida*. Finalmente, se realizan testeos sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles tales como las cepas de alto poder patogénico, *K. pneumoniae* BLEE+ y *A. baumannii* Carbapenemasas+.

La segunda parte del trabajo doctoral está dirigida a la búsqueda, identificación, purificación y caracterización de **nuevos inhibidores de proteasas presentes en los EPVs**, que hayan presentado alguna de las actividades biológicas nombradas anteriormente (antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anticoagulante, hipoglucemiante) además de su función natural como inhibidores de proteasas. Es así que el **capítulo 3** de esta tesis doctoral, estuvo centralizado en el aislamiento, purificación y caracterización de un nuevo inhibidor de proteasas cisteínicas aislado de *Moringa oleifera*. El **capítulo 4** se basó en el aislamiento, purificación y estudio cinético-molecular de un nuevo inhibidor de proteasas serínicas aislado de *Geoffroea decorticans*. El **capítulo 5** se refirió al aislamiento y caracterización bioquímica y biológica un nuevo inhibidor de proteasas serínicas aislado de *Capsicum annumm*.

La tercera parte del trabajo doctoral, expuesta en el **capítulo 6**, estuvo dirigida a la identificación y caracterización de **péptidos nativos** (NO inhibidores de proteasas) con actividad antioxidante y anticoagulante, obtenidos a partir de semillas de *Geoffroea decorticans*.

Índice

Introducción y objetivos generales

Introducción.....	2
1. Antecedentes.....	2
1.1. Productos Naturales de plantas y su utilización en Biomedicina, Salud y Nutrición...	3
1.2. Importancia de la búsqueda de moléculas estables y su papel en ciertas aplicaciones bioquímicas.....	6
2. Productos peptídicos naturales de plantas con actividad antimicrobiana.....	8
Péptidos y proteínas antimicrobianas y su función en la defensa de las plantas.....	8
3. La relación entre las bacterias patógenas y los productos antimicrobianos.....	10
3.1. Mecanismos de resistencia bacterianos.....	12
3.2. Diseños para el cribaje de sistemas enzimáticos de resistencia en las bacterias patógenas de la población.....	13
3.3. Especies bacterianas seleccionadas para esta tesis.....	17
4. Hongos levaduriformes e infecciones por levaduras.....	19
4.1. Actividad antifúngica: tratamientos vigentes anti-candidas.....	20
4.2. Extractos vegetales con actividades antifúngicas.....	22
5. Actividad antioxidante.....	23
6. Actividad anticoagulante.....	24
7. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.....	25
8. Inhibidores de proteasas. Introducción.....	26
8.1. Inhibidores peptídicos de proteasas vegetales (IPPs).....	29
8.2. Caracterización y aplicaciones potenciales de los IPPs de plantas.....	31
8.3. Aplicaciones farmacéuticas de los IPPs.....	33
8.4. Inhibidores de proteasas con actividad antimicrobiana.....	34
8.5. Inhibidores de proteasas con actividad antioxidante.....	34
8.6. Inhibidores de proteasas con actividad anticoagulante.....	35
9. Material vegetal seleccionado.....	36
9.1. Brassica napus L. “Canola, Colza” (Brassicaceae).....	36
9.2. Chenopodium quinoa Willd “Quinoa, Quinoa” (Amaranthaceae).....	37
9.3. Morinda citrifolia L. “Noni” (Rubiaceae).....	38
9.4. Moringa oleifera Lam. “Moringa, Paraíso blanco” (Moringaceae).....	40
9.5. Geoffroea decorticans (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart. “Chañar” (Fabaceae).....	41
9.6. Salvia hispanica L. “Chía” (Lamiaceae).....	42
9.7. Solanum tuberosum L. “Papa, Patata” (Solanaceae).....	43
9.8. Capsicum annumm L. “Pimiento, Aji” (Solanaceae).....	44
Objetivos	
10. Objetivos generales.....	46
11. Objetivos específicos.....	47

Extracción, estudio y parcial caracterización biológica de los materiales vegetales seleccionados

1. Metodología.....	50
1.1. Obtención de los EPVs.....	50
1.2. Cuantificación de proteínas de los EPVs.....	50
1.2.1. Estimación del contenido proteico por el método de Bradford (1976).....	50
1.2.2. Estimación del contenido proteico por el método de Lowry (1951).....	51
1.3. Screening de actividad inhibitoria de proteasas de los EPVs.....	51
1.3.1. Determinación de actividad inhibitoria de tripsina.....	51
1.3.2. Determinación de actividad inhibitoria de papaína.....	52
1.4. Método para concentración de proteínas: Liofilización.....	53
1.5. Electroforesis SDS-PAGE.....	54
1.6. Evaluación de actividad antioxidante.....	55
1.7. Evaluación de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.....	56
1.8. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana.....	57
1.8.1. Determinación de la capacidad inhibitoria del crecimiento en medio de cultivo sólido.....	57
1.8.2. Determinación de la capacidad inhibitoria del crecimiento en medio de cultivo líquido.....	58
1.8.2.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los EPVs, en caldo de cultivo por medio de la medición de la Absorbancia.....	58
1.8.2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana en caldo (microplaca) utilizando resazurina como indicador de la viabilidad celular.....	60
1.8.3. Estudio de la actividad de los EPVs sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles.....	61
Pruebas en medio sólido	
1.8.4. Testeos de la actividad de los EPVs sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles.....	63
Pruebas en medio líquido.	
1.9. Actividad antifúngica.....	68
Ensayos de actividad antifúngica en medio sólido.	
2. Resultados y discusiones.	
2.1. Estimación del contenido proteico en los EPVs (extractos crudos y tratamientos térmicos).....	69
2.2. Perfil electroforético de los EPVs.....	70
2.2.1. Brassica napus.....	70
2.2.2. Chenopodium quinoa.....	71
2.2.3. Morinda citrifolia.....	72

2.2.4. <i>Moringa oleífera</i>	73
2.2.5. <i>Geoffroea decorticans</i>	74
2.2.6. <i>Salvia hispánica</i>	75
2.2.7. <i>Solanum tuberosum</i>	76
2.2.8. <i>Capsicum annum</i>	77
2.3. Screening de actividad inhibitoria de proteasas.....	78
2.3.1. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Brassica napus</i>	79
2.3.2. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Chenopodium quinoa</i>	80
2.3.3. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Morinda citrifolia</i>	81
2.3.4. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Moringa oleífera</i>	82
2.3.5. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Geoffroea decorticans</i>	83
2.3.6. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Salvia hispánica</i>	84
2.3.7. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Solanum tuberosum</i>	85
2.3.8. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Capsicum annum</i>	86
2.4. Evaluación preliminar de actividad antioxidante de los EPVs.....	87
• Actividad antioxidante por ABTS.....	87
2.5. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa de los EPVs.....	89
2.6. Actividad antibacteriana de los EPVs.....	90
2.6.1. Ensayos de inhibición de los extractos sobre el crecimiento bacteriano en medios sólidos.....	90
2.6.2. Ensayos de inhibición de los extractos sobre el crecimiento bacteriano en medios líquidos.....	96
2.6.3. Ensayos de inhibición de bacterias con mecanismos enzimáticos de resistencia a antibióticos en medio sólido, intrínseca y combinada.....	105
• Estudio de las actividades inhibitorias de los extractos de <i>Morinda citrifolia</i>	106
• Estudio de las actividades inhibitorias de los extractos de <i>Moringa oleífera</i>	108
2.6.4. Ensayos de inhibición de bacterias con mecanismos enzimáticos de resistencia a antibióticos en medio líquido, intrínseca y combinada.....	111
• Testeo de las actividades inhibitorias de los extractos de <i>Morinda citrifolia</i>	112
• Testeo de las actividades inhibitorias de los extractos de <i>Moringa oleífera</i>	116
2.7. Actividad antifúngica de los EPVs.....	121
3. Conclusiones de este capítulo.....	123

Purificación y caracterización bioquímica y biológica de un potente y termorresistente inhibidor de papaína de Moringa oleifera (MoPI). Potencial aplicación como antibacteriano y anticoagulante natural

1. Introducción.....	125
1.1. Proteasas cisteínicas y sus inhibidores.....	125
1. 2. Propiedades nutricionales y medicinales de la Moringa.....	127
2. Objetivos.....	128
3. Metodología.....	129
3.1. Preparación de los Extractos.....	129
3.2. Purificación parcial por tratamiento térmico.....	129
3.3. Cromatografía de afinidad.....	130
3.4. Análisis enzimático de la actividad inhibitoria frente a papaína.....	130
3.4.1. Determinación del IC ₅₀	131
3.4.2. Determinación de Ki.....	131
3.5. Actividad anticoagulante.....	131
3.5.1. Tiempo de protrombina (TP).....	132
3.5.2. Tiempo de tromboplastina parcial activada (aTTP).....	132
3.6. Actividad antibacteriana.....	132
3.7. Actividad antioxidante.....	133
3.7.1. Metodo de ABTS.....	133
3.7.2. Metodo de DPPH.....	133
3.8. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.....	133
3.9. Análisis estadístico.....	133
4. Resultados y discusiones.....	134
4.1. Aislamiento y purificación de MoPI.....	134
4.2. Purificación de un inhibidor de papaína de moringa (MoPI) mediante cromatografía de afinidad.....	136
4.3. Cinética de inhibición.....	137
4.4. Actividad anticoagulante.....	139
4.5. Actividad antimicrobiana.....	139
4.6. Actividad antioxidante.....	141
4.7. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.....	141
5. Conclusiones de este capítulo.....	142

Purificación y caracterización bioquímica y biológica de un potente y termorresistente inhibidor de tripsina de *Geoffroea decorticans* (GdTI). Potencial aplicación como anticoagulante e hipoglucemiante.

1. Introducción.....	144
1.1. Resumen de las propiedades nutricionales y medicinales del Chañar.....	144
1.2. Proteasas serínicas e inhibidores de proteasas serínicas.....	144
• Inhibidores de serín proteasas.....	145
• Inhibidores de tripsina.....	145
2. Objetivos.....	145
3. Metodología.....	146
3.1. Material vegetal y obtención del extracto crudo.....	146
3.2. Determinación del contenido proteico.....	146
3.3. Ensayos cinéticos de inhibición de Tripsina.....	146
3.4. Purificación parcial por tratamiento térmico.....	146
3.5. Purificación por cromatografía de exclusión molecular.....	146
3.6. Cromatografía de afinidad a Tripsina.....	147
3.7. Análisis por electroforesis.....	147
3.8. Determinación por espectrometría de masas MALDI TOF/MS.....	147
3.9. Efecto del pH y la temperatura.....	148
3.10. Cálculo de IC ₅₀ y estudios cinéticos.....	148
3.11. Actividad anticoagulante.....	149
3.12. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.....	149
3.13. Análisis estadístico.....	150
4. Resultados y discusiones.....	150
4.1. Aislamiento y purificación de un inhibidor de tripsina obtenido de semillas de chañar.....	150
4.2. Purificación por tratamiento térmico.....	150
4.3. Purificación por cromatografía de exclusión molecular y de afinidad.....	153
4.4. Caracterización del inhibidor de tripsina de <i>G. decorticans</i> (GdTI).....	154
• Cinética de inhibición.....	154
4.5. Determinación de la masa molecular por MALDI TOF/MS.....	156
4.6. Identificación proteica mediante PMF MALDI TOF.....	157
4.7. Estabilidad a la temperatura y al pH.....	158
4.8. Actividad anticoagulante.....	161
4.9. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.....	162
4.10. Actividad antioxidante.....	163
5. Conclusiones de este capítulo.....	164

Aislamiento y caracterización de un inhibidor de serín proteasa obtenido a partir de semillas de *Capsicum annuum* (YBPTI). Potencial aplicación como agente antioxidante, antifúngico e hipoglucemiante.

1. Introducción.....	166
1.1. Resumen de las propiedades nutricionales y medicinales del morrón.....	166
1.2. Proteasas serínicas y sus inhibidores.....	166
2. Objetivos.....	166
3. Metodología.....	167
3.1. Aislamiento y caracterización biológica del inhibidor de tripsina de morrón amarillo.	167
3.2. Purificación parcial mediante tratamiento térmico.....	167
3.3. Purificación mediante técnicas cromatográficas. Cromatografía de afinidad a tripsina.	167
3.4. Caracterización bioquímica. Ensayos de estabilidad.....	167
3.4.1. Efecto de la temperatura.....	167
3.4.2. Efecto del pH.....	168
3.5. Actividad antioxidante.....	168
3.6. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.....	168
3.7. Actividad antimicrobiana.....	169
3.7.1. Actividad antibacteriana y antifúngica.....	169
3.7.2. Análisis por microscopía óptica.....	169
3.7.3. Ensayo de absorción de SYTOX Green.....	169
3.7.4. Ensayo de citotoxicidad celular.....	170
4. Resultados y discusiones.....	171
4.1. Estudio de la actividad inhibitoria de tripsina de los extractos de morrón amarillo y purificación parcial por tratamiento térmico.....	171
4.2. Purificación del inhibidor de tripsina mediante técnicas cromatográficas.....	171
4.2.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad.....	171
4.3. Caracterización bioquímica. Ensayos de Estabilidad. Efecto de la temperatura y pH extremos sobre la actividad de YBPTI.....	174
4.4. Actividad antioxidante.....	177
4.5. Actividad antimicrobiana.....	179
4.6. Evaluación de la capacidad de YBPTI de inhibir el crecimiento de <i>Candida albicans</i> .	179
4.6.1. Cultivos en placas de agar.....	179
4.6.2. Cultivos en medio líquido.....	183
4.6.3. Análisis por microscopía óptica y evaluación de viabilidad por absorción de sytox Green.....	184
4.7. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.....	188
4.8. Ensayos de citotoxicidad celular de YBPTI.....	190
5. Conclusiones de este capítulo.....	192

Aislamiento y purificación de fracciones peptídicas con propiedades antioxidantes y anticoagulantes a partir de semillas de chañar.

1. Introducción.....	194
2. Objetivos.....	195
3. Metodología.....	195
3.1. Aislamiento por tratamiento térmico y análisis densitográfico.....	195
3.2. Cromatografía de exclusión molecular.....	196
3.3. Determinación por espectometrías de masas MALDI TOF/MS.....	196
3.4. Actividad antioxidante.....	196
3.5. Actividad anticoagulante.....	196
3.6. Análisis estadístico.....	197
4. Resultados y discusiones.....	197
4.1. Obtención y caracterización de los extractos.....	197
4.2. Determinación de IC ₅₀ por ABTS y DPPH de GdTT, GdEC y fracciones peptídicas.....	198
4.3. Actividad antioxidante de las GdAPs.....	204
4.4. Actividad anticoagulante de las GdAPs.....	207
5. Conclusiones de este capítulo.....	209

	Página
Conclusiones generales	211
Bibliografía	214
Anexo I	249
Anexo II	254
Anexo III	258
Anexo IV	264

CAPÍTULO 1

Introducción y Objetivos Generales

Introducción

1. Antecedentes.

Este plan de trabajo se complementa y emerge de los proyectos: “Estudio de Inhibidores Peptídicos de Proteasas Aislados de Alimentos de Origen Vegetal: Potenciales Aplicaciones como Agentes Medicinales Nutracéuticos, Anti-Infectivos Naturales y Conservantes Naturales para la Industria Alimentaria”, código PICT-2016-4365 y el proyecto I+D de la UNLP: “Inhibidores peptídicos de proteasas aislados de alimentos de origen vegetal: Potenciales aplicaciones como agentes medicinales nutracéuticos, anti-infectivos naturales y conservantes biológicos para la industria alimentaria” (año 2020- Código X-920). En ambos proyectos, entre otros objetivos, se plantea investigar diversas actividades biológicas de biomoléculas proteicas aisladas y purificadas a partir de extractos vegetales de plantas alimentarias, con el objeto de emplearlos como desarrollo de formulaciones antibióticas naturales y/o conservantes naturales de alimentos, o como alternativa terapéutica natural como agentes anticoagulantes, antioxidantes e hipoglucemiantes para su potencial uso en el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas prevalentes, como las cardiovasculares y sus comorbilidades (trombosis, hipertensión arterial, etc.). Ambos proyectos son dirigidos por el Dr. Walter David Obregón, director de tesis del Bioq. Santiago Pablo Claver.

1.1. Productos Naturales de plantas y su utilización en Biomedicina, Salud y Nutrición.

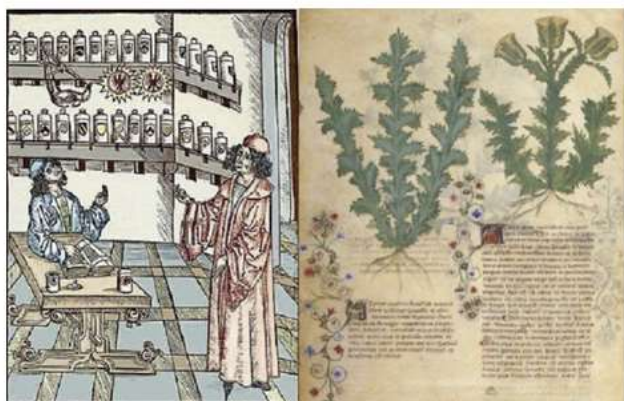


Registros arqueológicos de la utilización de plantas para uso medicinal.

Fuente: <https://exerens.com/es/plantas-medicinales-nos-ayudan-desde-la-antiguedad/>

Los productos naturales constituyen una de las mayores fuentes biológicas para el desarrollo de medicamentos, debido a su gran diversidad química y estructural y su baja toxicidad inicial. Las plantas producen compuestos naturales que actúan como una fuente importante de moléculas bioactivas con una amplia gama de objetivos biológicos (Harvey, 2008; Harvey et al., 2015; Clemons et al., 2010). Desde la antigüedad, la naturaleza (hongos, plantas, bacterias, etc.), ha proporcionado muchos extractos bioactivos que son ricos en moléculas para el tratamiento de enfermedades, por lo que son fuentes atractivas de nuevos compuestos para el posible descubrimiento de fármacos. Hay evidencias científicas de que los neandertales, hace 49.000 años, en el Paleolítico Medio (Edad de Piedra), usaban las plantas para resolver problemas de salud. Las civilizaciones hindúes, chinas, griegas, egipcias, mesopotámicas y los textos bíblicos muestran el uso de diversas hierbas y minerales con fines medicinales desde hace 5 mil años (Chaudhury et al., 2002; De Pasquale, 1984, Gewali et al., 2008; Gurib-Fakim, 2006). Incluso hoy en día, las prácticas medicinales tradicionales y los remedios naturales son igualmente relevantes en las prácticas farmacéuticas modernas en todo el mundo.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 65-80 % de la población de los países en vías de desarrollo, depende esencialmente de las plantas para la atención primaria de la salud. Sin embargo, pocas plantas han sido científicamente estudiadas para asegurar su calidad, seguridad y eficacia (Newman et al., 2010, 2016; Cragg et al., 2016; World Health Organization (WHO), 2007).



Registros medievales de plantas medicinales

Fuente: <https://www.alamy.es/wild-cardus-ruta-sylvestris>

También se ha estimado que el 74% de los compuestos derivados de las plantas medicinales fueron descubiertos después de investigaciones basadas en tradiciones etnobotánicas. A la actualidad han proporcionado aproximadamente el 50 % de todos los productos farmacéuticos modernos (Pandey et al., 2013). Incluyendo aquellos de uso humano para el tratamiento de las

enfermedades producidas por virus y bacterias (Van Vuuren et al., 2010; De Wet et al., 2012; Semenya et al., 2013; Mulaudzi et al., 2013).

Desde 1981 hasta el 2014, de las 1355 entidades químicas aprobadas por la FDA (United States Food and Drugs Administration), el 70% derivan directa o indirectamente de productos naturales incluyendo vacunas, péptidos y proteínas. Entre estas entidades aprobadas, 182 son productos naturales (Newman et al., 2010, 2016, Cragg et al., 2013).

En los últimos años, la búsqueda de compuestos naturales con aplicación medicinal está en aumento porque el uso de drogas sintéticas implica altos costos en los tratamientos, efectos secundarios como toxicidad y reducción en la eficacia. Por ello ha surgido la necesidad de complementar el tratamiento con medicamentos naturales (Otvos et al., 2019). Por tal motivo, el uso de productos naturales para la prevención o el tratamiento de enfermedades humanas continúa siendo un área de intensa investigación. Aproximadamente 3.000 millones de personas, casi la mitad de la población mundial, corren el riesgo de contraer enfermedades infecciosas (Lindahl et al., 2015). Ese peligro es mayor en condiciones de vida deficientes donde los tratamientos son inadecuados o inaccesibles. En aquellas regiones geográficas de clima cálido y con alta humedad, también afectan a la salud humana pues se dan las condiciones para el desarrollo de enfermedades causadas por diferentes tipos de microorganismos patógenos. A pesar que estas situaciones han prevalecido en las regiones subdesarrolladas, el cambio climático global, ha provocado que aparezcan nuevas regiones de riesgo mostrando una mayor incidencia de enfermedades transmitidas por vectores de clima cálido, como malaria y dengue. Se ha estimado que, entre 2030 y 2050, el cambio climático podría sumar otras 250,000 muertes anuales causadas por malaria, diarrea, calor extremo y desnutrición (OMS, 2019). Además, el aumento de las migraciones intra e intercontinentales de patógenos también contribuye a la llegada de infecciones nuevas y emergentes como tuberculosis y malaria. Nuevas terapias alternativas como la homeopatía y la medicina ayurvédica están resurgiendo en los últimos años, en menor escala, para proporcionar soluciones a las enfermedades de los ancianos y las enfermedades derivadas de las condiciones de vida actuales (estrés, comida chatarra, competitividad). En un futuro cercano más de la mitad del arsenal farmacoterapéutico consistirá en productos biofarmacéuticos, cuya transición representará un gran desafío debido a la complejidad y dificultad en el manejo de esas moléculas. Actualmente, más de la mitad de todos los medicamentos de moléculas pequeñas aprobados por la FDA, derivaron estructuralmente de compuestos de origen natural (Newman et al., 2010, 2007).

De esta manera, los productos biofarmacéuticos naturales emergen como nuevas alternativas terapéuticas a los productos convencionales obtenidos por síntesis química. Los productos biofarmacéuticos producidos a partir de materiales de origen biológico o biotecnológico son a veces análogos a las proteínas humanas o tienen una estrecha relación con esas moléculas. Sin embargo, las proteínas de origen humano son más eficaces en muchas terapias y poseen menores efectos secundarios que sus similares de origen ovino o porcino como en el ejemplo de ciertas insulinas.

Uno de los problemas más graves para el campo biomédico es la creciente aparición de bacterias multirresistentes, que socavan la eficacia de los antibióticos actuales y amenazan los sistemas de salud, generando la actual crisis de resistencia a los antibióticos. Las bacterias rápidamente obtienen mutaciones ventajosas porque la rapidez del crecimiento bacteriano permite seleccionar incluso las mutaciones más raras. Los antibióticos nunca son efectivos a largo plazo, lo que suscita un creciente interés en la búsqueda de nuevos compuestos naturales con actividades antibacterianas y antifúngicas para su aplicación en las industrias biomédica, biotecnológica y alimentaria (Cox et al., 2013; Blair et al., 2015). Esta situación, entre otras causas, se ha atribuido al uso excesivo y la prescripción incorrecta de antibióticos. Contrariamente, la disponibilidad de nuevos antibióticos en general se reduce debido a los obstáculos económicos y regulatorios (Martins et al., 2018). Por lo tanto, la comunidad científica también está buscando alternativas terapéuticas naturales para reemplazar los antibióticos de síntesis química que, actualmente se están volviendo obsoletos.

Por otro lado, la creciente demanda de alimentos en el mundo es preocupante, y es necesaria la correcta conservación de los mismos. El uso de productos naturales como conservantes de alimentos es una alternativa ecológica frente al uso de compuestos sintéticos. En los últimos años, la industria alimentaria se ha visto obligada a buscar nuevos conservantes que sean tanto naturales como estables, con el fin de extender la vida media de los alimentos y preservar la seguridad de su calidad. El deterioro y la contaminación microbiana de los alimentos se ha convertido en una preocupación mundial (Ananou et al., 2007; Tajkarimi et al., 2010). Tradicionalmente, el control del deterioro de los alimentos durante el almacenamiento y de la contaminación bacteriana patógena se logró principalmente a través de antibióticos y la aplicación de técnicas de conservación como tratamiento térmico, salado, acidificación y secado. Sin embargo, el uso de productos químicos sintéticos se ha limitado debido a las consecuencias médicas indeseables, como pueden ser derivadas de una eliminación incompleta de los patógenos, incluido el cáncer, la toxicidad aguda y la teratogenicidad. En el caso de los productos sintéticos, se pudo observar que presentan, n

muchos casos, períodos de degradación lenta, además, pueden conducir a la contaminación del medio ambiente (Davidson et al., 2013).

Una percepción pública negativa de los antimicrobianos sintetizados químicamente en los alimentos ha generado recientemente una creciente demanda de los consumidores de productos naturales como bioconservantes para reemplazar los compuestos químicos. El uso de conservantes de origen natural sería beneficioso a través del control del crecimiento del patógeno, o una disminución en el desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte del patógeno o por un fortalecimiento del sistema inmune en humanos, mientras se mantiene la capacidad de mejorar la calidad y la vida útil de los alimentos perecederos (Fратиanni et al., 2013; Hintz, 2015).

Las moléculas antimicrobianas proporcionan la primera línea de defensa contra los microbios patógenos tanto en plantas como en animales: de hecho, varias moléculas antimicrobianas de plantas que inhiben el crecimiento de los principales patógenos agronómicos se han aislado de diversas fuentes vegetales (Boman, 2003; Bulet et al., 2004; Van Loon et al., 2006; Parisi et al., 2008).

1.2. Importancia de la búsqueda e identificación de moléculas estables y su papel en ciertas aplicaciones bioquímicas.

La búsqueda de nuevas moléculas de origen natural con estabilidad fisicoquímica ha generado un interés particular por la ciencia y la tecnología, principalmente debido a las numerosas ventajas en el empleo de esos compuestos. Por ejemplo, muchas de ellas, no necesitan requisitos especiales como el almacenamiento a temperaturas frías o cálidas, medios especiales de estabilización, preservación en buffers y/o requerimiento de un ambiente no oxidativo, entre otros. Hacia el año 2018, el número de productos biofarmacéuticos individuales que obtuvieron una licencia en EEUU y la Unión Europea asciende a 374, de los cuales 285 contienen ingredientes biofarmacéuticos activos distintos. Dentro de esos productos se incluyen 68 anticuerpos monoclonales, 23 hormonas proteicas ó peptídicas, 16 factores de coagulación, 9 enzimas, 7 vacunas, 5 productos a base de ácido nucleico y 4 productos a base de células diseñadas (Walsh, 2018). Muchos de esos agentes son muy lábiles, tienen poca estabilidad frente a cambios en el pH y/o temperatura; mientras que otros son macromoléculas de alto peso molecular, lo que dificulta su acceso a regiones de vascularización fina y hace que su vida media sea generalmente bastante corta.

Existe actualmente, para la comunidad científica, una importante oportunidad para probar la eficacia de las medicinas tradicionales y para el descubrimiento de nuevos

compuestos bioactivos. Entre los compuestos naturales, se encuentran los productos del metabolismo primario, que son compuestos producidos por casi todas las plantas por ser esenciales para las vías bioquímicas que controlan el crecimiento, la fotosíntesis, la respiración, transporte de sustancias, asimilación de nutrientes, la floración, la maduración de los frutos, etc. son indispensables para la vida de la planta. Los metabolitos secundarios de las plantas, Por lo general, son los que dan los olores, colores, sabores y propiedades medicinales de ciertas plantas (y microorganismos). Son muy variados en su estructura y no están uniformemente distribuidos en todos los vegetales. No intervienen en los procesos fisiológicos básicos, como los primarios, de modo que su ausencia no causa ningún problema. Aunque son dependientes de los mismos sistemas enzimáticos que los primarios y se forman a partir de éstos, y en general están restringidos a especies específicas. Por ejemplo, proteínas, lípidos, carbohidratos, terpenos, polifenoles y carotenoides. En cuanto a las moléculas proteicas, se han aislado y caracterizado varias proteínas y péptidos con posibles aplicaciones biotecnológicas y biomédicas, por ejemplo, quitinasas, β -1,3-glucanasas, proteínas similares a taumatinas, endoproteasas, peroxidasas, proteínas similares a ribonucleasas, γ -tioninas y defensinas vegetales, oxalato oxidasas, proteínas similares a oxalato-oxidasa, proteasas e inhibidores de proteasas (Kim et al., 2009; Shamsi et al., 2016). Una de las hipótesis fundamentales de la medicina herbaria es que los productos naturales, de composición química compleja, contienen una combinación de compuestos que, muchas veces, son más eficaces y menos tóxicos que cualquier componente aislado. Sin embargo, para comprender completamente la actividad de un producto complejo es necesario identificar los compuestos químicos aislados responsables de esa actividad y cómo interactúan entre sí. Por lo tanto, es de interés el estudio de los compuestos aislados, así como de los extractos vegetales de los que se aíslan.

2. Productos peptídicos naturales de plantas con actividad antimicrobiana.

Péptidos y proteínas antimicrobianas y su función en la defensa de las plantas.

Las plantas producen una amplia gama de péptidos antimicrobianos de forma constitutiva o en respuesta a infecciones por patógenos, estrés abiótico y daño mecánico, incluido el daño causado por insectos y herbívoros. Las pérdidas de cultivos debidas a estos ataques son una gran amenaza para la seguridad alimentaria mundial. Las plantas poseen sistemas de defensas contra un patógeno que incluye el uso de barreras físicas (pared celular), inducción de respuesta de defensa hipersensible, resistencia y síntesis de péptidos antimicrobianos (PAMs), entre otras. Los PAMs son péptidos ubicuos de bajo peso molecular que muestran una resistencia de amplio espectro contra bacterias, hongos y virus.

Por tal motivo, los PAMs constituyen interesantes agentes terapéuticos que podrían ser utilizados en patologías humanas y de animales de crianza. Las investigaciones sobre PAMs, se han incrementado año tras año, proveyendo en la última década grandes descubrimientos sobre la base de datos de 3425 entradas de proteínas de este tipo. (<http://aps.unmc.edu>; Wang, et al., 2004; 2016; Beutler, 2005; Zasloff, 2002; Brogden 2005; Wong et al., 2007). En general, los PAMs son péptidos de bajo peso molecular compuestos de menos de <100 aminoácidos que muestran una actividad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias, hongos y virus (Barbosa Pelegrini et al., 2011; Van Der Weerden et al., 2013). El PAM más pequeño conocido contiene 7 aminoácidos (lys-val-phe-leu-gly-leu-lys) y es proveniente de *Jatropha curcas* (Xiao et al., 2011). Este péptido de 1 kD es activo contra múltiples patógenos bacterianos. El hecho de que los PAMs sean activos a una concentración de μM hace que sean potentes proteínas de defensa. En el caso de PAMs producidos por bacterias son denominadas bacteriocinas, y tienen una especificidad relativamente alta hacia especies/géneros estrechamente relacionados en comparación con sus eucariotas homólogos que pueden actuar contra diversos microbios (Nissen-Meyer et al., 1997; Hassan et al., 2012).

Los PAMs de plantas se clasifican en función de su estructura y presencia de enlaces disulfuro, y entre las principales clases encontramos: ciclótidos, defensinas, proteínas similares a heveína, proteínas de transferencia de lípidos, inhibidores de la familia de las serpientes, tioninas y proteínas similares a vicilina (Goyal & Mattoo, 2014) (Fig. 1).

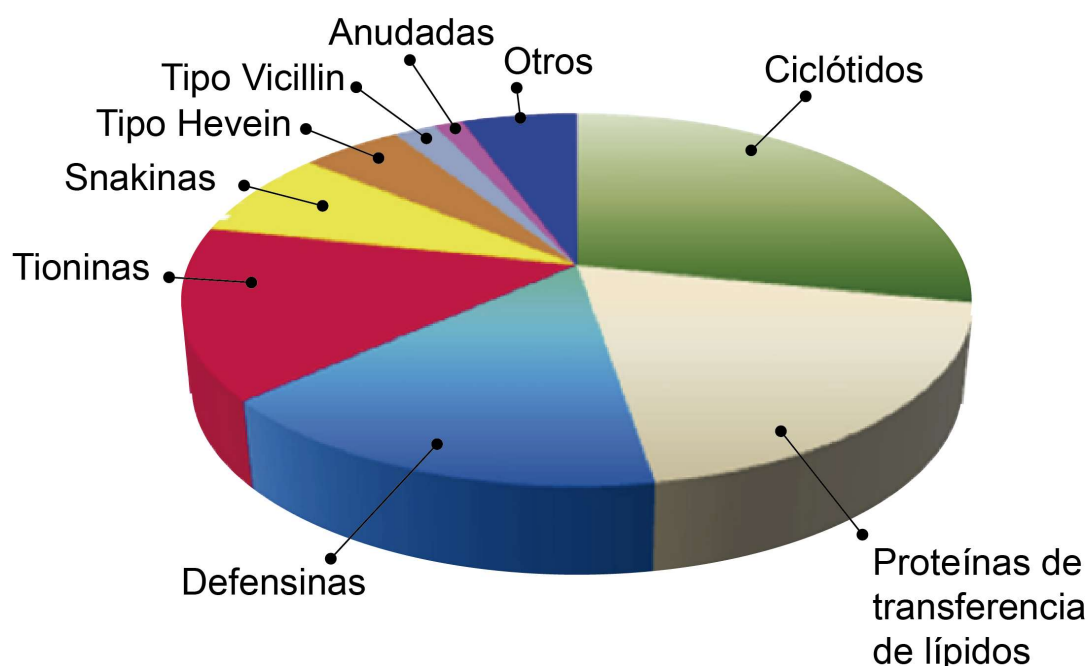


Figura 1: Distribución de las diferentes clases de PAMs de las plantas.
Figura obtenida de (Goyal & Mattoo, 2014).

Otros PAMs son las IbPAM (Thevissen, et al., 2005) que consisten en péptidos de albúmina 2S, puroindolinas, horquillas, barrelinas y péptidos libres de cisteína ricos en glicina, que presentan una composición única de aminoácido como estructura, haciéndolos diferentes a los anteriormente mencionados (Valueva et al., 2004; Pignol et al., 2006; Shamsi et al., 2018). La mayoría de los PAMs tienen carga neta positiva a pH fisiológico y, por lo tanto, se denominan comúnmente PAMs catiónicos. La carga positiva del péptido ayuda a la unión del PAM a la superficie cargada negativamente de los microorganismos e intensifican la actividad antimicrobiana. Los PAMs de plantas son ricos en cisteínas, que ayudan a estabilizar su estructura a través de la formación de puentes disulfuro, pero la estabilidad de la estructura no parece correlacionarse con la potencia de los PAMs (Barbosa Pelegrini et al., 2011; Stotz et al., 2013). Sin embargo, la actividad de los péptidos cisteinérgicos depende esencialmente de la integridad de los enlaces S–S (Haag et al., 2012). Diferentes clases de PAMs muestran actividad contra una amplia gama de microorganismos. Casi la mitad de los PAMs aislados de plantas poseen actividad antifúngica. Alrededor de 30 PAMs, la mayoría de los cuales incluyen ciclótidos, muestran actividad contra virus. Los PAMs de plantas con carga neta negativa se conocen como PAMs aniónicos (Prabhu et al., 2013).

Las pourotioninas, aisladas del trigo (*Triticum aestivum*) en 1972, fueron el primer péptido antimicrobiano vegetal que se informó que tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de varios patógenos de plantas. A lo largo de los años, los péptidos antibacterianos se han convertido en herramientas interesantes en el desarrollo de nuevas técnicas para el control de pérdidas de cultivos, así como en la producción de nuevos antibióticos para el tratamiento de muchas infecciones humanas. La actividad antimicrobiana del péptido vegetal MBP-1, aislado por Duvick (Duvick, 1992) de granos de maíz, fue informada como eficaz contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como contra varios hongos filamentosos (Salouti et al., 2016). Por otro lado, se examinó la actividad antimicrobiana sinérgica de una mezcla de péptidos que contenían plantas autóctonas australianas utilizando microorganismos de prueba seleccionados: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Shami et al., 2013). También, se han aislado péptidos antimicrobianos, ricos en residuos de cisteína, a partir de semillas de *Abelmoschus moschatus* (Dokka et al., 2014).

3. La relación entre las bacterias patógenas y los productos antimicrobianos.

La patogenicidad es una noción compleja, que implica interacciones entre el huésped, su microbiota y el medio ambiente, así como interacciones entre diferentes microorganismos y/u ocasionalmente el intercambio por vectores (plásmidos, virus, etc). Todos estos elementos combinados, inician la compleja cascada, desencadenando diferentes enfermedades. No debemos ignorar el punto de entrada y el nicho ecológico de cada microorganismo, por ejemplo, una especie comensal podría volverse patógena si atraviesa una barrera y coloniza otros sitios humanos. Por ejemplo, *Escherichia coli*, una bacteria comensal bien conocida en el intestino humano que es patógena en sitios extracolónicos. Aunque la dosis infecciosa es un factor importante que inicia un proceso de enfermedad, las condiciones de las infecciones polimicrobianas y nosocomiales no pueden ser explicadas por los postulados de Kochs (Fuentes Castillo, 2007; Volcy, 2008). La infección polimicrobiana depende del huésped específico y la interacción entre microorganismos. Después de lesiones traumáticas, la microbiota comensal puede colonizar lesiones, lo que resulta en infección. *Staphylococcus aureus*, uno de los patógenos más comunes aislados durante las infecciones polimicrobianas, puede interactuar con otras bacterias por cooperación (p.ej., con *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis*) o por competencia (por ej., con *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*), lo que resulta en una cepa más resistente (resistencia a los antibióticos adquirida) y mayor potencial de virulencia. Las infecciones nosocomiales son afectadas por dispositivos médicos y microbiota. Debido a la dificultad de definir especies

comensales, oportunistas o estrictamente patógenas, se agrupan las especies que afectan a seres humanos en función de su clasificación como microorganismos infecciosos en relación con su riesgo biológico de infección. La mayoría de las especies aisladas en seres humanos (2042 de 2172 especies, 94 %) pertenecen al grupo de riesgo 1 (definido por un riesgo individual o comunitario bajo o nulo), que incluye agentes biológicos que probablemente no causen enfermedades en los seres humanos sanos. Se identifican 103 (5 %) de 2172 especies en el grupo de riesgo 2 (definido por un riesgo individual moderado y un riesgo comunitario bajo), que incluye agentes biológicos que pueden causar enfermedad en una persona individual, pero es poco probable que se propague a la comunidad más amplia, por lo que la enfermedad es prevenible o tratable. El grupo de riesgo 3 (definido por un alto riesgo individual y un bajo riesgo comunitario), consiste en 27 de 2172 especies (1 %), incluye bacterias que podrían estar involucradas en infecciones humanas graves o letales y podrían presentar un grave peligro para los trabajadores de la salud. Existen tratamientos y vacunas para estas enfermedades. No se asignaron bacterias al grupo de riesgo 4 (definido por un alto riesgo individual y un riesgo comunitario), para el cual no hay tratamiento o profilaxis efectivos (Hugon et al., 2015; IGEMF, 2019).

La evidencia indica que las bacterias son muy versátiles y adaptables, y para sobrevivir necesitan ser capaces de lidiar con sustancias tóxicas y/o productos de desecho de otros organismos. Los mecanismos de resistencia bacteriano descritos hasta el momento, son tan variados como las propias bacterias. A partir de 2016, se aprobaron 8 nuevos medicamentos, pero solo uno de ellos es un antibiótico novedoso. La mediana de tiempo en el proceso de aprobación de estos medicamentos fue de 6,2 años, y el costo por dosis de estos medicamentos oscila entre U\$D 2000 y U\$D 4200 (Reygaert, 2018). Más allá del tipo de desarrollo, bio guiado o de diseño, que se utilice para la obtención de nuevas moléculas para desarrollo de fármacos, el área en particular de las enfermedades infecciosas demanda de manera constante la investigación en este tema.

3.1. Mecanismos de resistencia bacterianos

La implementación terapéutica de las penicilinas en el año 1940, se vio aparejada con el descubrimiento de algunas cepas de *E. coli*, donde se observó la inactivación de las soluciones de penicilinas por una sustancia producida por dichas bacterias, reportando el primer caso de resistencia bacteriana (Abraham et al., 1940). En el año 1944, Kirby identificó que existían cepas de *S. aureus* que también producían una sustancia capaz de inactivar las penicilinas, que se denominó penicilinasa (Abarca et al., 2001). Más



Imagen de Alexander Fleming

Fuente: <https://www.biografiasyvidas.com/monografia/fleming/>

adelante, con la misma lógica de lo sucedido con la penicilina, con el surgimiento de nuevas familias de antibióticos, que, al tiempo de su implementación en el tratamiento de enfermedades, se observaban la aparición de nuevas enzimas capaces de inactivarlas sistemáticamente. Aquellas enzimas que inactivaban antibióticos con el anillo betalactámico, se las denominó betalactamasas. En 1960, al poco tiempo de implementarse la ampicilina, fue descrita una nueva enzima que cumplía con la misma función inactivadora. Años más tarde, al implementarse las aminopenicilinas, se aisló una *K. pneumoniae* productora de una nueva betalactamasa con capacidad de inactivación de estos nuevos antibióticos, así como de las incipientes cefalosporinas de primera generación (Casellas, 2011). Posteriormente, las enzimas que inactivaban penicilinas y cefalosporinas fueron denominadas de manera general como “betalactamasas”, las cuales son capaces de romper el puente amida del anillo penicilánico o cefalosporánico y producir derivados ácidos sin propiedades bactericidas. Así, fueron apareciendo nuevas variantes de estas enzimas inactivadoras de betalactámicos, producto de mutaciones en los genes que codificaban las betalactamasas sensibles a ácido clavulánico, son enzimas betalactamasas nombradas tipo TEM-1, TEM-2, SHV-1 (Bush, et al., 1995; Thomson, et al., 2005).

En 1983, un grupo de investigadores alemanes, aislaron de una cepa de *Klebsiella ozaenae* una nueva betalactamasa producto de mutaciones de la SHV-1, la cual nombraron SHV-2. La misma era capaz de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima) y el aztreonam (Knothe et al, 1983). En 1989, a estas enzimas se las llamaron, por primera vez, betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Philippon et al., 1989).

Actualmente hay descritas más de 160 tipos de TEM y 100 tipos de SHV. Las TEM provienen de información contenidas en plásmidos, mientras que las SHV tienen origen cromosómico (Abbas et al., 2022).

Otro subgrupo de las BLEE son las β -lactamasas AmpC, que pueden hidrolizar penicilinas, cefamicinas, oximinocefalosporinas y monobactams, pero no son activas frente a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos. Los genes que se encuentran en el cromosoma de algunos bacilos Gram negativos, se han integrado en elementos genéticos transferibles, lo que ha permitido su transferencia horizontal a microorganismos que carecen de forma natural de AmpC cromosómico o lo expresan a bajo nivel. La prevalencia de las infecciones causadas por bacterias productoras de AmpC plasmídica (pAmpC) varía en función del tipo de enzima y la localización geográfica. Los aislados bacterianos clínicos productores de pAmpC son con frecuencia resistentes a otros antimicrobianos, lo que reduce de manera importante las opciones terapéuticas (Rodríguez-Guerrero, 2022).

En respuesta a esta resistencia de amplio espectro a tantos tratamientos, los antibióticos de la clase de los carbapenémicos se han establecido como los agentes principales para tratar estas infecciones, usándose cada vez más como la única terapia eficaz. La capacidad de diseminación de resistencia a los carbapenémicos entre las enterobacterias se debe a la producción de enzimas denominadas carbapenemasas. Las infecciones por cepas productoras de carbapenemasas son una causa emergente de infecciones asociadas a atención en salud, estas infecciones son difíciles de tratar y se asocian con una alta mortalidad (OMS, 2017). Durante la última década, ha habido un aumento global alarmante en la incidencia y prevalencia de bacterias Gram negativas resistentes a los carbapenémicos.

3.2. Diseños para el cribaje de sistemas enzimáticos de resistencia en las bacterias patógenas de la población.

La OMS ha creado la red WHONET, como organismo oficial para el registro de la aparición de resistencias a los antimicrobianos emergentes a nivel global. El objetivo de la red WHONET, por lo tanto, es estandarizar, validar, investigar e informar los estudios de vigilancia epidemiológica de bacterias con mecanismos de resistencia.

Para poder concretar dicho objetivo en la práctica habitual del laboratorio, dicha red ha diseñado una serie de recomendaciones, según sea el mecanismo a detectar, en donde la mayoría de las metodologías, se basan en el estudio de los halos desarrollados en los cultivos bacterianos alrededor de algunos antibióticos específicos, o en las zonas de centrales entre

dos antibióticos diferentes. Pudiéndose a través de deformaciones en los halos producidos, determinar rápidamente la presencia de un mecanismo de resistencia específico.

En el caso de la detección de BLEE, la red WHONET recomienda sembrar una placa con medio de cultivo agar Müller Hinton (MH), con un inóculo 0,5 Mc Farland de la bacteria a estudiar, en la cual se ubica un disco que contiene amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) entre dos discos que contienen, cada uno por separado, Cefotaxima (CTX) y Ceftazidima (CAZ). Además, se coloca un disco con ác. borónico entre el disco con CTX y otro con CFO.

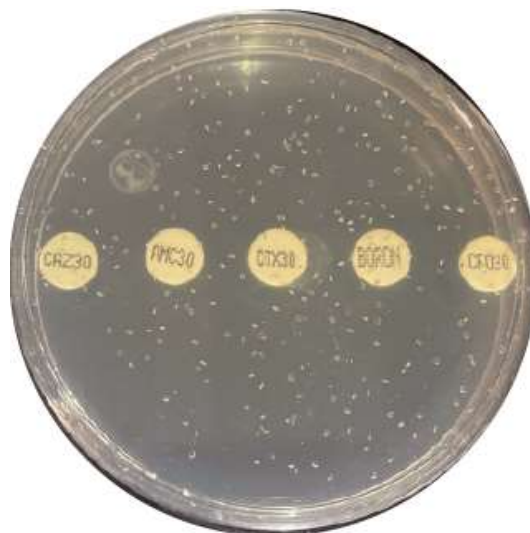


Figura 2: Diagrama de diseño y disposición de antibióticos, para la búsqueda de algunos mecanismos BLEE, propuestos por la red WHONET. Donde CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, CFO: Cefoxitina, AMC: Amoxicilina Clavulánico, BORON: Ac. Borónico

En la Figura 2 se muestra el diseño de placa que propone la red WHONET para investigar diferentes posibles mecanismos de BLEE en cepas bacterianas. La aparición de deformaciones en los halos de inhibición de CAZ, CTX o CFO en las zonas cercanas a los discos con ác. clavulánico o ác. borónico, confirmarían la presencia de mecanismo de resistencia en la cepa investigada.

En el caso de la detección de carbapenemasas la red WHONET recomienda sembrar una placa con medio de cultivo agar MH, con un inóculo 0,5 Mc Farland de la bacteria a estudiar, en la cual se ubica un disco que contiene Imipenem (IMI) y otro con Meropenem (MRP) con los que se pueden detectar la mayoría de las carbapenemasas que circulan en nuestro medio (KPC). En medio de los discos, tal como se muestra en la Figura 3, se coloca un disco de EDTA.

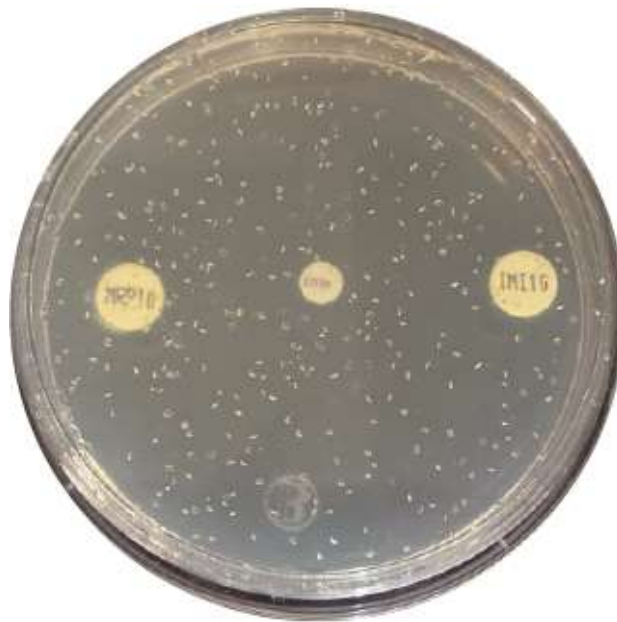
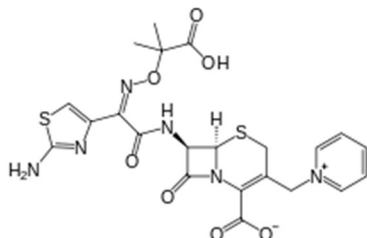


Figura 3: Diagrama de diseño y disposición de antibióticos, para la búsqueda de algunos mecanismos Carbapenemasas, propuestos por la red WHONET. Donde MRP Meropenem; EDTA Ácido Etilen Diamino-Tetra-Acético; IMI Imipenem.

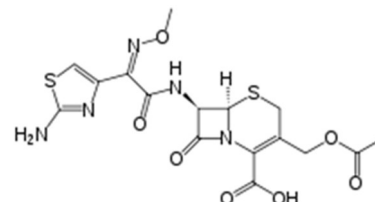
La aparición de deformaciones en los halos de inhibición de MRP o IMI en las zonas cercanas a EDTA, confirmarían la presencia de mecanismo de resistencia en la cepa investigada.

En la figura 4 se muestra la estructura química de los antibióticos utilizados.

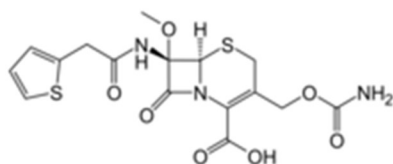
Ceftazidima ($C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$)



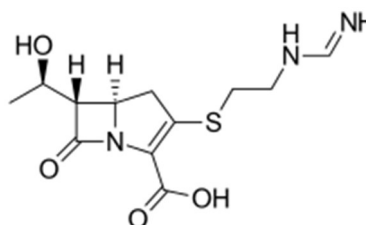
Cefotaxima ($C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$)



Cefoxitina ($C_{16}H_{17}N_3O_7S_2$)



Imipenem ($C_{12}N_3O_4S$)



Meropenem ($C_{17}H_{25}N_3O_5S$)

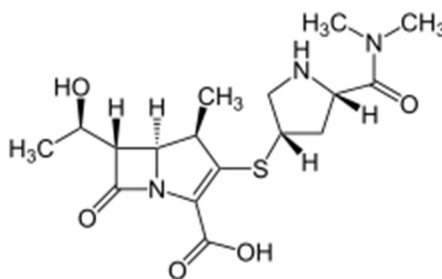


Figura 4: estructura química de los antibióticos utilizados para la detección de mecanismos de resistencia bacterianos.

Basándose en los resultados de estos experimentos, los actores de la salud, pueden tomar decisiones al momento de instaurar un tratamiento antibiótico, con mayor cantidad de elementos para que la efectividad del mismo sea la deseada. Ya que la simple utilización del antibiograma tradicional, puede acarrear errores a la hora de instaurar tratamientos terapéuticos que pueden fallar debido a mecanismos de resistencia inducibles, que no son detectables por la interpretación directa del antibiograma.

3.3. Especies bacterianas seleccionadas para esta tesis

Para la realización de este trabajo doctoral, se escogieron 5 especies bacterianas, representativas de los géneros con mayor casuística en los laboratorios de bacteriología con pacientes ambulatorios.

Escherichia coli

Es la bacteria más representativa de la familia *Enterobacteriaceae*. Compuesta por bacilos Gram negativos oxidasa-negativo. Coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento. *E. coli* es la responsable del mayor número de infecciones urinarias alrededor de todo el mundo y, aunque pertenece a la flora habitual del sistema digestivo, al invadir otras áreas puede producir severas infecciones que pueden llevar al paciente a la muerte. *E. coli* invade tejidos y los infecta, produciendo no solo infecciones urinarias, sino respiratorias, meningéas, oculares de catéteres, etc. Ciertas cepas productoras de toxinas, llegan a infectar el tracto digestivo produciendo diferentes tipos de diarreas, pudiendo en algunos casos, originar enterocolitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico (SHU), siendo este último caso un motivo de trasplante o muerte del individuo (Rivas, et al., 2006).

Klebsiella pneumoniae

Otro representante importante de la familia *Enterobacteriaceae*, con numerosos casos de infecciones urinarias detrás de la *Escherichia coli*. Son bacterias resistentes naturales a ampicilina, pero con gran capacidad para generar y adquirir factores de resistencia. En la década del 90 surgieron las primeras cepas con KPC (carbapenemasas) y desde entonces se han dispersado por todo el planeta generando severas infecciones intrahospitalarias con gran número de muertes. *K. pneumoniae*, es, además, causante de una variedad de infecciones, que incluyen, entre otras, neumonía, sepsis, infecciones del tracto urinario, bacteriemia, meningitis y abscesos hepáticos. También causa neumonías en la comunidad intrahospitalaria. Es una especie con gran capacidad de producir mecanismos enzimáticos de resistencia a antibióticos. (Carvalho et al., 2021)

Pseudomonas aeruginosa

Es una de las bacterias más representativas de los bacilos Gram negativos aerobios, oxidasa positiva. Entre sus mecanismos de virulencia, pueden producir toxinas y segregar alginatos, que generan colonias mucosas de muy bajo metabolismo debido a su bajo intercambio de nutrientes con el medio. Generan diferentes tipos de infecciones en pacientes habituales, pero

tienen altísima prevalencia en pacientes con enfermedades de base como diabetes y fibrosis quística y en pacientes trasplantados. Pueden sobrevivir a condiciones ambientales muy desfavorables, aún en soluciones antisépticas y presentan una amplísima resistencia a muchos antibióticos. *Pseudomonas aeruginosa* se ha convertido en un importante patógeno que causa entre el 10 % y 20 % de las infecciones en la mayoría de los hospitales. (Ayala et al., 2023)

Staphylococcus aureus

Es la bacteria más representativa y virulenta dentro de los cocos Gram positivos catalasa positivos. Aunque es flora habitual de piel y mucosas, ante lesiones o cirugías puede invadir los tejidos y generar severas infecciones. Responsable de un alto número de enfermedades respiratorias, forunculosis, fístulas, sepsis, etc, todos los años. Es uno de los principales causantes de infecciones post operatorias. Se han transformado en un problema aún peor desde la aparición de cepas Meticilino Resistentes. Genera infecciones frecuentes en neonatos, niños y adultos, quienes pueden ser colonizados por *S. aureus* y portar el microorganismo generalmente en fosas nasales y, en ocasiones, en la piel y la ropa. Desde estos sitios, puede transmitirse a otras regiones en la piel o a las membranas mucosas. Si estas barreras son interrumpidas por un trauma o una cirugía, *S. aureus*, que es un patógeno oportunista, que puede acceder al tejido provocando una lesión local. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro: infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque tóxico. El éxito de la colonización y la producción de enfermedades por *S. aureus* se debe a la expresión de factores de virulencia que participan en adhesión, adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune del huésped (Lowy, 1998; Camarena, 1999; Velázquez-Meza, 2005; Nodarse Hernández et al., 2013).

Enterococcus faecalis

Es el representante más importante de los *Enterococcus*, un subgrupo de los Cocos Gram positivos catalasa negativos. Este microorganismo es el responsable de un alto número de infecciones urinarias en la comunidad pero que ha generado serias infecciones en hospitales. Ha adquirido en ciertos casos resistencia a Vancomicina haciendo muy difícil su tratamiento. *Enterococcus faecalis* también es integrante de la microbiota intestinal habitual del hombre y otros animales, y es un indicador de contaminación fecal del agua y del medio ambiente. Se

han notificado en nuestro país aislamientos de *Enterococcus spp.* a partir de alimentos de origen animal. *E. faecalis* es la especie aislada con mayor frecuencia de muestras biológicas humanas y es considerado agente etiológico emergente de infecciones invasivas, capaz de transmitir resistencia antimicrobiana (Van Tyne et al., 2013).

4. Hongos levaduriformes e infecciones por levaduras.

Las infecciones fúngicas sistémicas plantean un grave problema clínico. Las opciones de tratamiento son limitadas y la resistencia a los medicamentos antimicóticos está aumentando. Además, una proporción sustancial de pacientes no responde a la terapia a pesar de estar infectados con hongos que son sensibles al fármaco. La discordancia entre el resultado general del tratamiento y los bajos niveles de resistencia clínica puede atribuirse a la tolerancia a los fármacos antimicóticos (Berman et al., 2020).

Los grupos etiológicos causantes de las mencionadas infecciones, se dividen en hongos filamentosos y levaduras. Los hongos filamentosos, poseen un ciclo de crecimiento lento y aunque su diagnóstico puede realizarse por cultivos, no hay metodologías avaladas para el estudio de su sensibilidad a antifúngicos. En el caso de las levaduras, si se han desarrollado métodos aprobados para los estudios de sus sensibilidades a antifúngicos (Castro Méndez et al., 2019).

Dentro del grupo de levaduras que son patógenas para el ser humano, uno de sus principales representantes son las de la especie *Candida spp.*, las que podemos describir como levaduras, pero en muchas ocasiones productoras de pseudomicelios. Las diferentes especies de *Candida* se han dispersado entre la comunidad generando gran cantidad de infecciones. Son responsables de muchas onicomycosis, infecciones de la piel y vulvovaginitis, pero también causan severas complicaciones en casos de pacientes inmunocomprometidos. El uso irresponsable de los antifúngicos ha llevado a la aparición de cada vez más resistencia a los azoles, dejando muy pocas opciones terapéuticas. La candidiasis es una infección común de la piel, la cavidad oral y el esófago, el tracto gastrointestinal, la vagina y el sistema vascular de los humanos. Aunque la mayoría de las infecciones ocurren en pacientes inmunocomprometidos o debilitados, el organismo responsable con mayor frecuencia de la enfermedad, *C. albicans*, expresa varios factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis. Estos factores incluyen biomoléculas de reconocimiento del huésped (adhesinas), morfogénesis (la transición reversible entre morfotipos unicelulares y filamentosos, formas de crecimiento), proteasas y fosfolipasas secretadas. Además, el cambio fenotípico se acompaña de cambios en la expresión de ciertos compuestos de la pared

(Martínez et al., 1990), la morfología de las colonias y las afinidades tisulares en *C. albicans* y varias otras *Candida spp.* El cambio en el fenotipo de *C. albicans* y otras *Candida spp.*, podría proporcionar a las células una flexibilidad que resulte en la adaptación del organismo a las condiciones hostiles impuestas no solo por el huésped, sino también por el médico que trata la infección (Calderone et al., 2001; Polke et al., 2015).

La candidemia es una de las infecciones del torrente sanguíneo más comunes asociadas con la atención médica y el tipo más frecuente de infección fúngica invasiva. El aumento de la resistencia a los antimicrobianos en *Candida spp.* como agente etiológico de candidemia es motivo de preocupación ya que son infecciones graves con altas tasas de mortalidad. En la práctica clínica de rutina es más probable que se identifiquen a nivel de especie a las levaduras del género *Cándida* recuperadas del torrente sanguíneo que aquellas recuperadas de sitios no estériles. La candidemia está asociada principalmente a la atención médica, por lo que se espera que la mayoría de los casos correspondan a pacientes hospitalizados (Duque et al., 2016; Velastegui et al., 2019; Salinas et al., 2022).

4.1. Actividad antifúngica: tratamientos vigentes anti-candidas.

La baja resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol (FCZ) permitió su uso más generalizado a partir de los años ochenta, entre otras razones porque coincidió con la pandemia de HIV y las indicaciones terapéuticas derivadas de ésta. Además de las ventajas farmacocinéticas del FCZ en relación con su posología, también la disponibilidad en el mercado facilitó su uso; sin embargo, como consecuencia de su uso tan generalizado, se ha desarrollado en levaduras como *Candida spp.* el riesgo potencial de resistencia. En la actualidad, la resistencia informada al FCZ en especies de *Candida albicans* es cercana al 3 %, con variaciones regionales y locales muy notorias. Hasta el 10 % de los pacientes con sida y candidiasis mucocutánea presentaba resistencia a FCZ antes del surgimiento de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARAE), la cual se relacionó con las dosis administradas o la duración del tratamiento, por lo que se interpretó como un tipo de resistencia adquirida. En los últimos años, con el uso de TARAE, los episodios de candidiasis mucocutánea recurrente son cada vez menos frecuentes y, por esta condición, la resistencia a los azoles actualmente no es de gran impacto en los países industrializados. Esto, sin embargo, no es extrapolable a países en condiciones de extrema pobreza, como los del continente africano, donde se siguen reportando porcentajes significativos de *Candida spp.* resistente a azoles aisladas en orofaringe de pacientes con VIH, con informes de *Candida albicans* resistente a fluconazol hasta en el 9,5 % (Quintero, 2011; Sanguinetti et al., 2015).

El Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (en adelante GLASS, por sus siglas en inglés “Global Antimicrobial Resistance Surveillance System”) tiene como objetivo apoyar la implementación del Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos, mediante la promoción y el fortalecimiento de la vigilancia estandarizada de la resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial. En el GLASS se combinan los datos de los pacientes con los del laboratorio y la vigilancia epidemiológica para mejorar la comprensión del alcance y los efectos de la resistencia a los antimicrobianos en las poblaciones. Aunque los hongos en gran medida están fuera del punto de vista de la salud pública, también son una causa importante de enfermedad y muerte en los seres humanos, y la resistencia a los antimicóticos es un problema creciente, como lo es para los antibióticos. Los datos de susceptibilidad antifúngica de los aislamientos de *Cándida* recuperados especialmente de pacientes en unidades hospitalarias de alto riesgo (por ejemplo, unidades de cuidados intensivos), disponibles a través del GLASS, proporcionan una visión general de la resistencia emergente en *Cándida spp.* (Fisher et al. 2022).

A diferencia de las bacterias, la identificación precisa y las pruebas de susceptibilidad antifúngica de *Cándida spp.* siguen siendo un gran desafío para la mayoría de los laboratorios a nivel mundial, debido a que muchos de ellos carecen de esta capacidad. Una limitación importante es que solo se han establecido puntos de corte para las especies más comunes de *Cándida*, siendo estos puntos de corte diferentes según la especie. Adicionalmente, la experiencia necesaria para realizar las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos por los métodos de referencia, método de micro dilución en caldo, en general se restringe a laboratorios especializados. La identificación también presenta sus limitaciones, la mayoría de los laboratorios se basan en métodos fenotípicos que solo permiten diferenciar las especies más comunes. A diferencia de las pruebas de susceptibilidad bacteriana, las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos siguen siendo un gran desafío, incluso en países desarrollados (Dennis et al., 2021).

4.2. Extractos vegetales con actividades antifúngicas.

Existen pocas clases de medicamentos antimicóticos efectivos disponibles para el tratamiento de enfermedades fúngicas de las plantas, animales y humanos. El mayor desarrollo de antifúngicos compuestos con diversas estructuras químicas y nuevos mecanismos de acción es necesario porque aumentó alarmante de la incidencia de enfermedades infecciosas nuevas y reemergentes, así como resistencia a los medicamentos utilizados actualmente (Pathadka et al., 2021).

Existen publicaciones de extractos de *Bucida buceras*, *Breonadia salicina*, *Harpephyllum caffrum*, *Olinia ventosa*, *Vangueria infausta* y *Xylothea kraussiana*, en las que estas especies de plantas fueron reportadas debido a la excelente actividad observada contra dos patógenos fúngicos animales (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*). Además, estas especies de plantas poseen una fuerte actividad contra patógenos fúngicos de plantas (Mahlo et al., 2016).

También podemos mencionar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de plantas indígenas y exóticas empleadas en la medicina tradicional argentina, mediante el método de difusión en placa de agar utilizando pocillos, contra los hongos dermatofitos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum* y contra la levadura *Candida albicans*. De las 21 especies estudiadas, 19 mostraron actividad apreciablemente mayor que el nitrato de miconazol empleado como control (Prado et al., 2011).

A pesar de existir numerosas referencias biológicas/reportes científicos acerca de diversas actividades antimicrobianas de péptidos nativos de extractos vegetales, no existen reportes similares de actividades antioxidantes, anticoagulantes e hipoglucemiantes en proteínas/péptidos de dicho origen, excepto en proteínas sometidas a procesos de hidrólisis o hidrolizados proteicos vegetales.

Solo se han encontrado referencias de proteínas nativas vegetales con tales propiedades en revistas/escritos locales/regionales que no han sido sometidos a controles o evaluaciones estrictas realizadas por revisores científicos de reconocimiento internacional.

No obstante, en función de la importancia de la búsqueda de estas actividades, en el marco de esta tesis doctoral, se hará una breve introducción de dichas actividades, junto con la escasa información bibliográfica de extractos vegetales que las posean.

5. Actividad antioxidante.

La oxidación es la transferencia de electrones desde un átomo a otro y representa una parte esencial en nuestro metabolismo. Los problemas surgen cuando el flujo de electrones se desacopla, es decir, cuando en la transferencia los electrones se encuentran desapareados generando radicales libres. Los radicales libres del oxígeno se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluye al ion superóxido (O_2^-), los radicales: hidroxilo ($HO\cdot$), peroxilo ($ROO\cdot$) y alcoxilo ($RO\cdot$) y el óxido nítrico (NO). El radical hidroxilo (vida media de 10^{-9} s) y los radicales libres alcoxilo (vida media de segundos) son muy reactivos y atacan rápidamente las moléculas de las células cercanas causándoles daño; los procesos de reparación celular subsanan los ataques de los ROS menos reactivos. Además de estos ROS anteriormente mencionados, en los organismos vivos hay otros ROS no radicales, como el oxígeno singlete (1O_2), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl) (Pietta, 2000). Los ROS son producidos continuamente por el cuerpo durante la respiración celular y también durante ciertas funciones inmunes (respuesta inmune primaria). Un radical libre se define como especie química que posee uno o más electrones no apareados y es capaz de existir independientemente. Los radicales son moléculas altamente inestables. Los ROS son radicales capaces de oxidar biomoléculas y, por tanto, estos compuestos son llamados oxidantes. Los ROS se producen continuamente durante los eventos fisiológicos normales y pueden iniciar fácilmente la oxidación de lípidos de membrana, lo que conlleva a una acumulación de peróxidos lípidos. En concentraciones fisiológicas, los ROS son necesarios para la función celular normal, pero también son capaces de dañar biomoléculas cruciales tales como los ácidos nucleicos, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados y carbohidratos. Además, pueden causar daño en el DNA provocando mutaciones. Si los ROS no son eliminados efectivamente por los constituyentes celulares pueden estimular reacciones en cadena de radicales libres que pueden conducir a condiciones de enfermedad (Halliwell et al., 1990).

Un antioxidante es una molécula capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas. En cuanto a los alimentos, un antioxidante se ha definido como cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con la del sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación del sustrato (Halliwell et al., 1989; Sies, 1993; Halliwell, 1995). Los compuestos antioxidantes pueden eliminar los restos radicales y aumentar la vida útil al retrasar el proceso de peroxidación lipídica, que es una de las principales razones del deterioro de alimentos y productos farmacéuticos durante el procesamiento y almacenamiento

(Halliwell, 1996). Los antioxidantes también pueden proteger al cuerpo humano de los radicales libres y retrasar el progreso de muchas enfermedades crónicas.

Antioxidantes sintéticos (t-butil hidroquinona, propil galato y butil hidroxianisol) pueden controlar eficazmente la oxidación de los nutrientes de los alimentos. Además, la ingesta dietaria de antioxidantes, podría reducir el riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo. Sin embargo, los antioxidantes sintéticos tienen la desventaja de poseer altos costos y el riesgo potencial de toxicidad. Con la creciente demanda de los consumidores de proteínas con alto contenido nutricional y funcional, los investigadores han cambiado su enfoque desde proteínas de materias primas tradicionales hasta proteínas vegetales. En particular, los péptidos antioxidantes naturales originados a partir de proteínas vegetales han capturado la atención mundial debido a sus ventajas de protección del medio ambiente, sostenibilidad, bajo costo y sin efectos secundarios tóxicos. (Wen et al., 2020).

En los últimos años ha crecido el interés por identificar fuentes naturales alternativas y seguras, especialmente de origen vegetal. Los antioxidantes a menudo son agregados a los alimentos para prevenir las reacciones en cadena de los radicales de oxidación; inhibiendo la iniciación y el progreso de eventos que conducen al deterioro del alimento (Shahidi, 1992).

6. Actividad anticoagulante.

Las enfermedades cardiovasculares, como la trombosis, son la principal causa de muerte en todo el mundo. Desde el punto de vista terapéutico, para el tratamiento de la trombosis se emplean fármacos con efecto anticoagulante durante tiempos prolongados. La administración de fármacos sintéticos con acción antitrombótica presenta efectos secundarios (hemorragias, neutropenia, trombocitopenia y toxicidad hepática). Por lo tanto, es de interés la búsqueda de alternativas terapéuticas en su reemplazo. En este sentido, el estudio de proteínas alimentarias ha recibido gran atención por su efecto beneficioso, no solo desde un punto de vista nutricional sino funcional, aportando un valor agregado en la regulación de diferentes procesos fisiológicos (Nadeeshani et al., 2022; Claudia Sato et al., 2012).

La producción de péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática, por procesos fermentativos o liberados por proteólisis durante la digestión gastrointestinal, es objeto de estudio por las potenciales actividades biológicas. Entre ellas, aquellos péptidos bioactivos con actividad antitrombótica resultan de gran interés debido a su implicancia sobre el sistema cardiovascular en la reducción del efecto causado por la formación de trombos (Mukherjee et al., 2012).

El Tiempo de Protrombina (TP) y el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) son pruebas globales para medir parámetros de la hemostasia, que son empleados en bioquímica clínica para detectar las causas de algunos desórdenes hemostáticos.

El TP es una prueba que permite evaluar la vía extrínseca y común de la coagulación, midiendo el tiempo de coagulación de un plasma descalcificado a 37°C, en presencia de un exceso de tromboplastina tisular y calcio. El APTT es una prueba que permite detectar anormalidades en la vía intrínseca de la coagulación, midiendo el tiempo que tarda en coagular un plasma descalcificado, a 37°C, en presencia de un exceso de activador plasmático, fosfolípidos de cerebro de conejo y cloruro de calcio.

De las plantas se pueden obtener fármacos naturales con actividad anticoagulante. El reino vegetal es rico en metabolitos bioactivos secundarios que, además de ser eficaces antioxidantes, también pueden poseer propiedades anticoagulantes y antiplaquetarias y, por ello, podrían utilizarse para el tratamiento de enfermedades trombóticas. El análisis de los datos de la literatura encontrados demuestra que los compuestos bioactivos de muchas plantas muestran una promisorio actividad antiplaquetaria y/o anticoagulante que los convierte en excelentes candidatos potenciales, para ser utilizados como nuevos compuestos naturales capaces de interferir con la hemostasia primaria y secundaria (Manicam et al., 2010; de Souza et al., 2019; López Villarreal et al., 2022). Además, podrían utilizarse junto con los anticoagulantes actualmente administrados en la práctica clínica para aumentar su eficacia y reducir las complicaciones en el tratamiento de los trastornos trombóticos (Lamponi et. al., 2021).

7. Actividad inhibitoria de la α -glucosidasas.

Las α -glucosidasas son enzimas en el tracto digestivo que hidrolizan los carbohidratos en glucosa (Lebovitz et al., 1997). Entre las enfermedades metabólicas más prevalentes en el mundo se encuentra la diabetes mellitus tipo 2, que se caracteriza por hiperglucemia (es decir, altos niveles de glucosa en la sangre). La inhibición de la enzima α -1,4-glucosidasa evita la liberación de glucosa libre de carbohidratos complejos, de este modo baja los niveles de glucosa en sangre (Jaiswal et al., 2012). Una estrategia que se ha desarrollado para tratar la diabetes tipo 2 es la inhibición de la actividad de las α -glucosidasa mediante fármacos sintéticos. Sin embargo, estos inhibidores generalmente se asocian con efectos secundarios gastrointestinales. Por tanto, el desarrollo de inhibidores a partir de productos naturales ofrece una opción alternativa para el control de la hiperglucemia. Los efectos secundarios graves y la toxicidad asociada con algunas drogas terapéuticas influyen directamente en la demanda

de agentes antidiabéticos derivados de la dieta o alternativas consideradas naturales y seguras. En los últimos años, se han realizado varios estudios para identificar inhibidores de α -glucosidasa de fuentes naturales como las plantas, y muchos candidatos han resultado ser metabolitos secundarios, incluidos alcaloides, flavonoides, fenoles y terpenoides. (Assefa, 2020)

Hay numerosas especies vegetales con posible actividad hipoglucemiante. Algunas de ellas están siendo ampliamente estudiadas y, aunque es necesario realizar un mayor número de ensayos clínicos controlados, los resultados de los trabajos realizados en los últimos años son muy positivos, por la eficacia que se desprende de ellos y por la escasa toxicidad a las dosis recomendadas, por lo que podrían utilizarse durante largos períodos (Medeiros et al., 2019).

Entre las numerosas especies vegetales con posible actividad hipoglucemiante, algunas son conocidas y se utilizan en los países occidentales desde hace siglos, como son la goma guar y la alholva; otras son menos conocidas y proceden de diferentes medicinas tradicionales, especialmente de la china y la ayurvédica, como son *Momordica charantia*, *Gymnema silvestre*, y *Anemarrhena asphodeloides* (Bortolotti et al., 2019).

Se ha reportado para su potencial acción en diabetes a los extractos de corteza de raíz de *Euclea undulata*, quienes exhiben una gran actividad hipoglucemiante. Se reporta una inhibición del 50% para α -glucosidasa y para α -amilasa, usando concentraciones de 49,95 $\mu\text{g/mL}$ y 2,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. También se reporta que extractos de *Schkuhria pinnata* y *Elaeodendron transvaalense* tienen actividad inhibitoria tanto de α -glucosidasa como de α -amilasa (Deutschländer et al., 2009).

8. Inhibidores de proteasas.

Como se mencionó anteriormente, entre los compuestos naturales de composición proteica encontramos a los inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs). Los IPPs son moléculas reguladoras que se encuentran en numerosos tejidos y fluidos de animales, plantas y microorganismos, que controlan la actividad de sus proteasas diana, bloqueando en algunos casos su actividad exacerbada y descontrolada (Farmer et al., 1990; Bode, 1992). La principal función fisiológica de los IPPs endógenos es la prevención de la proteólisis no deseada, tanto en la mayoría de los procesos fisiológicos normales, así como en circunstancias patológicas. Esa participación en la regulación de la actividad proteolítica incluye la activación de coenzimas y la liberación de polipéptidos biológicamente activos (Laskowski 1980, 1986). La presencia de IPPs en el plasma de mamíferos sugiere la participación de esas proteínas en la

regulación de la coagulación sanguínea y otras cascadas proteolíticas, como la activación del complemento (Laskowski, 1986).

La acción de los inhibidores enzimáticos en la investigación de fármacos se ha convertido en una herramienta fundamental en la industria farmacéutica pero también en el diagnóstico o terapéutica de patologías cardiovasculares, cáncer o enfermedad de Alzheimer (Shamsi et al., 2016). La proteólisis es fundamental para muchos procesos biológicos vitales, como la inmunidad, la coagulación sanguínea, la regulación del ciclo celular y la morfogénesis tisular (Udvardy, 1996; Heutinck et al., 2010). Una señal externa puede amplificarse rápidamente a través de la activación de una única proteasa que luego regula múltiples vías descendentes (Behrendt, 2012).

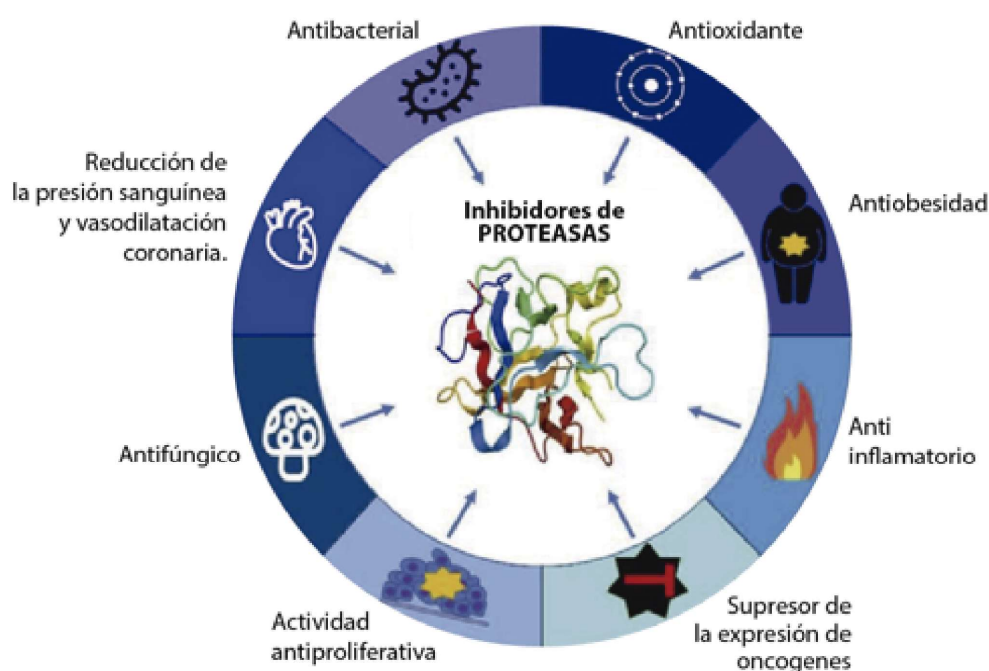


Figura 5:
Potenciales usos terapéuticos de los inhibidores de proteasas.
(Cid-Gallegos et al., 2022).

Entre los inhibidores de proteasas, los de naturaleza proteica son generalmente moléculas pequeñas de 15 a 60 aminoácidos con un alto contenido de residuos de cisteína que forman puentes disulfuro que confieren resistencia al tratamiento térmico, pH extremos o fuerzas iónicas y proteólisis. (Torres-Castillo et al., 2009; Rodrigues Macedo et al., 2011; Souza et al., 2014; Cotabarren et al., 2017; Monteiro Júnior et al., 2017, Martins 2018), aunque en los últimos años se han descubierto algunos de mayor peso molecular (Cisneros et al., 2020; Cotabarren et al., 2021).

En la actualidad, los IPPs tienen una serie de aplicaciones en biomedicina, biotecnología, industria alimentaria y diagnóstico. La mayoría de los compuestos farmacéuticos y nutracéuticos, que se comercializan son inhibidores de enzimas y, como tales, exhiben una acción específica dentro de las bacterias, virus, animales, plantas o el cuerpo

humano. Los compuestos nutraceuticos, son productos basados en ingredientes procedentes de la propia naturaleza (animales, plantas o minerales) y se caracterizan por ser ricos en determinados nutrientes, lo cual determina su incidencia en la nutrición y en nuestra salud. En organismos completos, estas moléculas representan una forma eficaz de controlar la actividad de las proteasas endógenas, enzimas que deben equilibrarse en un estado normal para efectuar una proteólisis controlada. La apoptosis, la coagulación sanguínea y las cascadas de señalización celular son algunos de los procesos en los que las proteasas escinden proteínas o proenzimas. Dado que una regulación precisa de la actividad proteolítica es esencial para la fisiología humana, muchas proteasas se han convertido en los principales objetivos biomédicos (Ward et al., 2009).

Los IPP de plantas, demuestran una creciente evidencia de que esas moléculas tienen efectos tanto preventivos como terapéuticos sobre varios cánceres comunes, así como sobre la esclerosis múltiple, los procesos inflamatorios y una serie de otras enfermedades (Lichtenstein et al., 2008; Kobayashi et al., 2009, 2013; Srikanth et al., 2016).

En la industria alimentaria, se ha producido un patrón claro de comercialización de alternativas naturales para la conservación de los alimentos, como resultado del efecto negativo de los conservantes sintéticos sobre la salud del consumidor. Otro efecto negativo es el aumento de microorganismos que manifiestan resistencias a los antibióticos y, por tanto, son más tolerantes a los métodos de procesamiento y conservación de alimentos (Barberis et al., 2018).

De acuerdo con este patrón, proponemos que ciertos IPPs podrían explorarse para su uso como conservantes naturales de alimentos envasados debido a sus propiedades antimicrobianas (Kim et al., 2006; Habib et al., 2016; Macedo et al., 2016), especialmente porque son moléculas, que nunca han estado expuestas a microorganismos y, por lo tanto, en principio, su novedosa utilización no encontraría resistencia microbiana inicial. La posibilidad de utilizar IPP como conservantes también representa un valor agregado debido a su capacidad inhibidora de proteasas, como lo demuestra la inhibición de proteasas en la industria alimentaria de pescado (Alarcón et al., 2001; Bijina et al., 2011; Singh et al., 2016; Srikanth 2017).

Además, las propiedades antioxidantes de ciertos IPPs agregarían un beneficio adicional en su uso para la conservación a largo plazo, al reducir la oxidación en los alimentos (Shamsi et al., 2018; Pignol et al., 2006).

8.1. Inhibidores peptídicos de proteasas vegetales (IPPs).

En las plantas, los IPPs también se han estudiado ampliamente debido a su papel fisiológico en la regulación de las proteasas endógenas, el almacenamiento, los mecanismos de defensa contra la infección por patógenos y su función potencial como compuestos anti-alimentarios protegiendo a las plantas contra los insectos herbívoros al inhibir las proteasas digestivas. (Lawrence et al., 2002; Valueva et al., 2004).

En semillas, tubérculos y otros órganos de almacenamiento de plantas, los IPPs representan aproximadamente el 10% del contenido total de proteínas, proporcionando las fuentes de carbono, nitrógeno y azufre necesarias durante la germinación (Mandal et al., 2002), pero la incidencia de estas proteínas en la parte aérea de las plantas, como resultado de varios estímulos, también se han documentado ampliamente (De Leo, 2002).

Los IPPs de plantas, además de los tejidos de almacenamiento como semillas y tubérculos, también están presentes en las hojas, flores y frutos (Meenu Krishnan et al., 2015; Padul et al., 2019), donde esos péptidos se almacenan y/o funcionan como reguladores endógenos de la actividad proteolítica (Grosse-Holz et al., 2016). La expresión de estos inhibidores varía según la etapa de maduración, la ubicación del tejido y el momento de la cosecha y el almacenamiento, así como la variedad vegetal, con la posible coexistencia de diferentes clases de inhibidores e isoformas en un solo tejido u órgano (Sels, 2008).

Los niveles elevados de IPPs se encuentran a menudo en plantas pertenecientes a las familias Solanaceae, Leguminosae (Fabaceae) y Gramineae (Poaceae) (Brzin et al., 1996; Xu, et al., 2001; Sin, et al., 2004).

Estas proteínas, al igual que las de fuentes no vegetales, se pueden clasificar según el sitio catalítico de la enzima diana. En consecuencia, se han identificado inhibidores contra serina, cisteína, aspártico y metaloproteasas, aunque no se han informado inhibidores de plantas contra las proteasas treonínicas o glutámicas (Martins, et al., 2018).

La mayoría de los IPPs de plantas son inhibidores de la serina-proteasa (Mello, 2002; Haq, 2003; Fan, 2005) y, como tales, se clasifican en más de 20 familias. Los inhibidores de serina-proteasas vegetales están ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal apareciendo en muchas especies de plantas (Fan et al, 2005), aunque la mayoría se han aislado de las familias Solanaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Poaceae y Cucurbitaceae. Los inhibidores de serin proteasas se clasifican en los siguientes grupos: Kunitz, Bowman-Birk; Patata I y Patata II; la superfamilia de calabaza, calabacín y cereales, entre otros. Los nuevos sistemas de clasificación incluyen grupos como 2S-albúmina, Grupo I y Grupo II, entre otros (Haq et al., 2004).

Los IPPs de plantas de los tipos Kunitz y Bowman-Birk se encuentran a menudo en miembros de la familia Fabaceae. Estos inhibidores se clasifican sobre la base de su contenido de residuos de cisteína y el número de sitios de unión a proteínas. De los dos, los inhibidores de tipo Kunitz son proteínas que suelen presentar una masa molecular de 18-24 kDa, con una o dos cadenas polipeptídicas y 4 residuos de cistina que forman 2 puentes disulfuro y con un único sitio de unión a proteínas (Bendre et al., 2018). Por el contrario, los inhibidores de Bowman-Birk son proteínas pequeñas (peso molecular aprox. 4-8 kDa) con 14 residuos de cistina que forman siete enlaces disulfuro intracatenarios o puentes disulfuro entre cadenas, y con dos sitios de unión a proteínas (Qi et al., 2005). Chiche et al, (2004) introdujeron por primera vez el inhibidor de la calabaza, una familia ahora bien establecida de inhibidores de serina-proteasa muy potentes aislados de las calabazas pertenecientes a la familia de las Cucurbitaceae. Estos inhibidores de calabaza estuvieron entre los primeros IPPs de plantas descubiertos con el llamado pliegue típico de Knottin (Chiche et al., 2018), un motivo estructural proteico que contiene tres puentes disulfuro, compartido por numerosos péptidos extraídos de plantas, animales y hongos.

La segunda clase de inhibidores más extensamente estudiados en plantas son las cisteín proteasas (Benchabane et al., 2010). Los inhibidores de cisteín proteasas son denominados generalmente cistatinas y, en el caso de las plantas, fitocistatinas. Las fitocistatinas se clasifican en 3 subfamilias: Grupo I, que comprende miembros de masa molecular de 12 a 16 kDa con un solo dominio de cistatina; Grupo II, de masa molecular 23 kDa y con dominios en sus extremos N- y C-terminales que confieren la capacidad de unirse y así inhibir cisteína proteasas de tipo C13 (Martínez et al., 2005); y finalmente el Grupo III, compuesto por multicistatinas que contienen dos o más dominios de tipo cistatina (Walsh et al., 1993).

Se han identificado y caracterizado como fitocistatinas de varias plantas, a saber, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. “Caupí” Familia Fabaceae (Fernandes et al., 1993); *Solanum tuberosum* L. “Papa” Familia Solanaceae (Waldron et al., 1993); *Brasica oleracea* var. capitata “Col” Familia Brassicaceae (Lim et al., 1996); *Ambrosia artemisiifolia* L. “Ambrosia” Familia Compositae (Rogers et al., 1993); *Daucus carota* L. “Zanahoria” Familia Apiaceae (Ojima et al., 1997); *Carica papaya* L. “Papaya” Familia Asteraceae (Song et al., 1995); *Malus domestica* Borkh. “Manzana” Familia Rosaceae (Ryan et al., 1998); *Arachis hypogea* L. “Aguacate” Familia Fabaceae (Kimura et al., 1995); *Castanea sativa* Milld, Familia Fabaceae “castañas” (Connors et al., 2002); y *Coix lacrima-jobi* L. “Lágrimas de Job” Familia Poaceae (Yoza et al., 2002). También se han aislado fitocistatinas de las semillas de una amplia gama de plantas

de cultivo; incluyendo *Helianthus annuus* L. “Girasol” Familia Astraceae; *Oryza sativa* L. “Arroz” Familia Poaceae, *Triticum spp.* “Trigo” Familia Poaceae, *Zea mays* L. “Maíz” Familia Poaceae; *Glycine max* (L.) Merr. “Soja” Fabaceae y *Saccharum officinarum* L. “Caña de azúcar” Familia Poaceae (Kuroda, 2001; Connors, 2002; Yoza, 2002; Haq et al., 2004).

Además, se han descrito algunos inhibidores de aspartato y metaloproteasa (Haq, 2005). Se han encontrado inhibidores de la aspartilproteasa, una clase de inhibidor de péptidos menos estudiada, en flores de girasol, *Hordeum vulgare* L. “Cebada” Familia Poaceae, *Cynara cardunculus var cardunculus* “Cardo de castilla” Familia Asteraceae y *Solanum tuberosum* L. “papa” Familia Solanaceae (Shamsi, 2016; Mares, 1989; Kervinen, 1999; Park, 2000, Cater, 2002). El inhibidor de la catepsina-D, un inhibidor de la proteasa aspártica que se encuentra en los tubérculos de papa y que contiene una considerable homología de secuencia de aminoácidos con el inhibidor de la soja-tripsina, es una proteína de 27 kDa que inhibe la catepsina D y las serinas proteasas tripsina y quimotripsina. aunque este IPP vegetal no inhibe las proteasas aspárticas pepsina, catepsina E y renina (Mares et al., 1989).

Los inhibidores de las metaloproteasas en las plantas son escasos, y hasta la fecha sólo se han aislado cinco y todos pertenecen a la familia de las solanáceas (Cotabarren et al., 2018; Rees et al., 1982; Arolas et al., 2007; Lufrano et al., 2015). Este grupo de inhibidores está representado por la familia de inhibidores de metalocarboxipeptidasa presente en plantas de *Solanum lycopersicum* L. “tomate” Familia Solanaceae y *Solanum tuberosum* L. “papa” Familia Solanaceae (Hass et al., 1975; Graham et al., 1981), de una masa molecular característica alrededor de 4 kDa y siendo este último el inhibidor más prevalente y ampliamente caracterizado. Esta familia de inhibidores contiene típicamente 3 enlaces disulfuro intramoleculares. Esta característica estructural da una alta relación de puentes disulfuro al número total de aminoácidos que constituyen la proteína, lo que convierte a las moléculas en estructuras compactas e inalterables, que representan una de las proteínas más estables de la naturaleza (Arolas et al., 2007; Lufrano et al., 2015; Cotabarren et al., 2018).

8.2. Caracterización y aplicaciones potenciales de los IPPs de plantas.

Los IPPs se encuentran ampliamente en plantas de cultivo y, aunque muestran una abundancia particular en leguminosas, también están presentes en cereales y tubérculos, donde forman parte de la defensa de la planta contra el ataque de plagas. Ese papel defensivo de los IPPs se basa en su inhibición de las enzimas digestivas de los insectos y de otras proteasas patógenas involucradas en ciertos procesos vitales, ya sea causando una escasez

crítica de aminoácidos esenciales (Hilder et al., 1993; Jongsma et al., 1997) o interfiriendo con procesos bioquímicos o fisiológicos esenciales (Gutierrez-Campos et al., 2000). En particular, los niveles altos de IPPs se asocian con la resistencia de las plantas contra insectos y microbios (Kim et al., 2009; Dunse et al., 2010). Aunque esta última función ha sido bien documentada, el mecanismo de protección vegetal per se aún no está claro. Se ha demostrado en ensayos directos o indirectamente mediante la expresión en plantas de cultivo transgénicas que muchos IPPs de plantas actúan como compuestos defensivos contra plagas (Valueva et al., 2004; Bayés et al., 2006; Quilis et al., 2007; Bobbarala et al., 2009; Sabotič et al., 2012; Quilis et al., 2014; Smid et al., 2015; Zhu-Salzman et al. 2015; Rocha et al., 2016; Cingel et al., 2017 Shamsi et al., 2018). También se ha informado la supresión de plagas de nematodos y la inhibición del crecimiento de varios hongos patógenos (Joshi et al., 1998). Además, se ha reportado que muchos IPPs que afectan negativamente el desarrollo de los insectos podrían servir como factores de resistencia transgénica (Shukle et al., 2003).

Por lo tanto, todas estas ventajas hacen que los IPPs de plantas sean candidatos ideales para aplicaciones biotecnológicas, especialmente en el desarrollo de cultivos transgénicos resistentes a plagas de insectos.

Las principales proteasas digestivas en el intestino medio de los insectos son serin proteasas con especificidades similares a la tripsina y la quimotripsina (Bown et al., 1997), que han mostrado diferencias en la interacción con los inhibidores, respecto de lo observado para las enzimas bovinas comerciales.

Por lo tanto, para lograr una estrategia efectiva de control de plagas, la selección de diferentes inhibidores que presenten alta estabilidad en un rango de condiciones es esencial junto con la determinación de las características catalíticas de las proteasas del intestino medio del insecto, así como los efectos de los inhibidores en esas actividades enzimáticas. Todas las características anteriores son la razón por la que se están incorporando los IPPs en la industria agrícola dentro de programas integrales de control de plagas (Shamsi et al., 2016).

Como se nombró anteriormente, varios IPPs vegetales poseen características estructurales especiales que se encargan de conferir a esos péptidos una notable estabilidad física y química, propiedades que han generado un especial interés en la búsqueda y caracterización de esas moléculas. En la naturaleza es escasa la cantidad de moléculas con estabilidades fisicoquímicas tales como resistencia a altas temperaturas, valores extremos de pH y/o alta salinidad, entre otras. Estas características suelen estar presentes en varios IPPs de plantas con el llamado nudo de cistina o pliegue de Knottin, que exhiben estructuras compactas y estables unidas por numerosos puentes disulfuro en relación con el número total

de aminoácidos constituyentes, con esta clasificación típica de muchos IPPs de plantas (Retzl et al., 2020). Varios IPPs vegetales han sido purificados y se encontró que son altamente estables y bastante activos hasta los 70°C (Prathibha et al., 1995). Incluso se han encontrado IPPs estables en un amplio rango de temperatura, manteniendo su actividad luego de ser incubados a temperaturas cercanas a los 100°C. De la misma manera, algunos estudios de estabilidad al pH indicaron que los IPPs vegetales eran funcionalmente estables dentro de diferentes rangos de pH, e incluso bajo condiciones altamente ácidas y alcalinas (pH 2–12) (Obregón et al., 2012; Cotabarren et al., 2020a).

Estas características, que constituyen cualidades especiales prometedoras en los IPPs además de sus múltiples actividades biológicas, han despertado un especial interés en la comunidad científica para realizar una investigación exhaustiva con el objetivo principal de mejorar el conocimiento sobre aplicaciones potenciales adicionales de los IPPs a los usos ya reportados. Por ello, el estudio de los IPPs de origen vegetal abre nuevos caminos en la investigación científica por el potencial uso de estas proteínas en biomedicina, biotecnología, agronomía y ciencia de los alimentos, especialmente en vista del limitado número de moléculas de origen natural que se utilizan en esos campos. También, resulta de interés, ampliar la descripción general de los IPPs derivados de plantas que exhiban alta estabilidad térmica y de pH, a fin de subrayar la relevancia de esta estabilidad fisicoquímica para la aplicación potencial de esos compuestos en biomedicina, agricultura, y la industria alimentaria. (Cotabarren et al., 2002a).

8.3. Aplicaciones farmacéuticas de los IPPs.

La potencialidad y eficacia terapéutica de los IPPs se han ejemplificado en el tratamiento de enfermedades inmunes, inflamatorias, respiratorias (Ottaviani et al. 2006), cardiovasculares y neurodegenerativas, como como enfermedad de Alzheimer (Wood et al., 2003) y han resultado útiles en el diseño de fármacos para prevenir la propagación de patógenos que causan enfermedades peligrosas, como SIDA (Arribas et al., 2005; Binford, et al., 2005), hepatitis (Lamarre et al., 2003; Malcolm et al., 2006), cáncer (Kennedy et al., 2002; Turk et al., 2004; Clemente et al., 2014) y malaria (Dash et al., 2003), entre otros (Ruseler et al., 2004; Johnson et al., 2006). En consecuencia, muchas referencias pueden ser encontradas en la literatura sobre los efectos beneficiosos que los IPPs de plantas podrían tener sobre tales patologías. La versatilidad observada en estas moléculas es verdaderamente notable, donde además se han notificado múltiples actividades biológicas, informándose entre

ellas la acción antitumoral (Souza et al., 2014), anticoagulante (Machado et al., 2003), antihipertensiva (Huang et al., 2008) y antioxidante (Shamsi et al., 2018; Shamsi et al., 2017).

8.4. Inhibidores de proteasas con actividad antimicrobiana

Tal como nombramos previamente, la aparición de bacterias con múltiples sistemas de resistencia se ha convertido en un grave problema mundial. Dichas cepas multirresistentes han adquirido diversas mutaciones que inutilizan y disminuyen la efectividad de las terapias con antibióticos, es mayor la velocidad de aparición de mecanismos de resistencia a antibióticos que nuevas familias de antibióticos que puedan contrarrestar o combatir las persistentes enfermedades bacterianas. Una explicación a la aparición de estos mecanismos es el uso excesivo y prescripción incorrecta de antibióticos. Complementariamente a este problema, la disponibilidad de nuevos antibióticos suele reducirse como resultado de obstáculos económicos y reglamentarios (Martins et al., 2018). Esa búsqueda de nuevas alternativas, es la razón por la cual el uso potencial de los IPPs como nuevos agentes antimicrobianos es prometedor, no solo como resultado de la notable estabilidad fisicoquímica de esas proteínas, (Torres-Castillo et al., 2009; Costa et al., 2014, Silva et al., 2015), Martins et al., 2018; sino también porque el número de artículos científicos que reportan IPPs con actividad antimicrobiana está en constante aumento (Habib et al., 2007; Kim et al., Montesinos et al., 2007; 2009; Satheesh et al., 2011; Zhao et al., 2014; De Brito et al., 2016; Macedo et al., 2016; Park et al., 2020).

8.5. Inhibidores de proteasas con actividad antioxidante.

Algunos estudios han informado las propiedades antioxidantes y antineoplásicas de inhibidores de proteasas de tripsina en ensayos *in vitro* (por ejemplo, en células A549). Los resultados muestran que dichos inhibidores poseen capacidad para prevenir el cáncer y las enfermedades causadas por el estrés oxidativo, proponiendo utilizados a los inhibidores como suplementos junto con los fármacos convencionales para aumentar la eficacia en el tratamiento de enfermedades como las enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis y el cáncer (Cotabarren et al., 2019).

Por otro lado, líneas transgénicas que sobre expresan un inhibidor de proteasa también mostraron una peroxidación lipídica reducida, así como una mayor actividad de los antioxidantes glutatión-s-transferasa y ascorbato peroxidasa, indicando una activación indirecta de la actividad antioxidante por parte de estos inhibidores (Malefo et al., 2020).

8.6. Inhibidores de proteasas con actividad anticoagulante.

Como habíamos mencionado, se conoce que los eventos trombóticos debidos a la coagulación de la sangre plantean un problema grave en las enfermedades cardiovasculares (Ishihara et al., T 2014). Aunque la heparina (un inhibidor de la proteasa ampliamente utilizado para retrasar el tiempo de coagulación de la sangre) se ha utilizado ampliamente para este propósito, su uso continuado a menudo resulta en el desarrollo de trombocitopenia y respuesta inmune (Lee et al., 2013). Además, otros fármacos anticoagulantes, como la aspirina y el clopidogrel, pueden provocar efectos secundarios graves (Eikelboom et al., 2012). En este contexto, algunos inhibidores de proteasas vegetales se han estudiado como posibles agentes antitrombóticos. El descubrimiento de nuevos IP con actividad inhibitoria de la cascada de la coagulación daría lugar a una estrategia alternativa frente a la trombosis (Batista, 1996; Oliva et al., 2000; Lazza et al., 2010; Brito et al., 2014; Fang et al., 2023).

9. Material vegetal.

El material vegetal seleccionado tiene su elección en provenir de plantas alimentarias o de consumo humano o animal en general, otorgando a los extractos obtenidos y sus moléculas purificadas una citotoxicidad para los humanos, limitada, o al menos sus niveles de tolerancia esperables son mayores. Se evaluarán extractos proteicos obtenidos de 8 especies diferentes de plantas.

9.1. *Brassica napus* L. “Canola, Colza” (Brassicaceae).

Esta especie, perteneciente a la familia Brassicaceae, se la conoce vulgarmente como colza o canola. Es una planta anual o bienal, glabra o subglabra. Las hojas son de hasta 40 cm, glaucas, glabras o muy a menudo ciliadas en los nervios o márgenes; las hojas inferiores, pecioladas, liradas, con 2-5 pares de segmentos laterales enteros y uno terminal mucho mayor, irregularmente dentado, mientras que las hojas superiores, son sésiles o subamplexicaules, oblongo-lanceoladas, enteras. Las flores están dispuestas en racimos de a 20-60. Las flores tienen sépalos de 5-10 mm, erecto-patentes, glabros. y pétalos 8-18 mm, amarillos. Posee frutos, sésiles, suberectos, con 12-18 semillas por lóculo, atenuados en rostro. Las semillas miden 1,2-1,8 mm de diámetro, y son esféricas, de un color pardo oscuro.

La especie se cultiva por todo el mundo para producir forraje, aceite vegetal para consumo humano y biodiésel. Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la colza era la tercera fuente de aceite vegetal. La semilla es la parte útil del fruto seco dehiscente (Musury & Fernandes, 2000).

En la medicina tradicional y natural se lo utiliza habitualmente como tónico, descongestivo de vías respiratorias, en algunos casos como antibacteriano, anticanceroso, diurético. Ejerce un efecto beneficioso sobre el sistema urinario, se le atribuye que puede purificar la sangre y que contribuye a la eliminación de toxinas (Estevez et al., 2014). El expeller fue donado por la empresa Greemborg S.A., de la localidad de Lincoln, provincia de Buenos Aires.



Semillas de Canola

Fuente:

<https://www.millerchemical.com/es/cultivos-y-soluciones/colza-canola/>



Imagen de flores y aceite de Canola

Fuente: <https://www.diet-health.info/es/recetas/ingredientes/in/ev9504-aceite-de-canola-refinado-ecologico>

9.2. *Chenopodium quinoa* Willd. “Quinoa, Quinua” (Amaranthaceae).

Esta especie conocida como quinua, quínoa, es una hierba perteneciente a la familia Amaranthaceae. Es nativa de los Andes, de Bolivia, Chile y Perú. Fueron las culturas prehispánicas las que la domesticaron y la cultivaron principalmente en toda la cordillera andina. Es una planta resistente, tolerante y eficiente en el uso del agua, con una extraordinaria adaptabilidad, pudiendo soportar temperaturas desde -4°C hasta 38°C y crecer con humedades relativas desde el 40 % hasta el 70 % (García-Parra, 2019).

La quinoa es una planta anual, dicotiledónea, usualmente herbácea, que alcanza una altura de 0,2 a 3,0 m, según genotipo y condiciones ambientales. Posee una raíz pivotante vigorosa, muy ramificada y las hojas son de carácter polimórfico. La inflorescencia es racimosa y pueden ser amarantiforme, glomerulada e intermedia. Las flores son muy pequeñas y densas, al igual que las fores de todas las quenopodiáceas, e incompletas dado que carecen de pétalos. El fruto es un aquenio indehiscente, que contiene un grano que puede alcanzar hasta 2,66 mm de diámetro, de acuerdo al genotipo y las condiciones en que crece. Los granos de quinoa presentan una diversidad de colores entre los que se pueden citar el blanco, negro, café, diferentes matices de púrpura, rojos, anaranjados y amarillos (Infante et al., 2018).

Su semilla provee todos los aminoácidos esenciales equiparándose su calidad proteica a la de la leche. Sus granos son altamente nutritivos, superando en valor biológico, calidad nutricional y funcional a los cereales tradicionales, tales como el trigo, el maíz, el arroz y la avena. Entre los principales efectos beneficiosos para la salud, atribuidos de medicina tradicional, podemos destacar, que ayuda a la pérdida de peso, ayuda a controlar los niveles de lípidos en sangre, mejora la piel, fortalece a los dientes, huesos y músculos (Bojanic et al., 2011; Bazile et al., 2016). La quinoa fue donada por la Cooperativa Agropecuaria y Artesanal Unión Quebrada y Valles Limitada (Cauqueva), de la provincia de Jujuy.



Imagen de semillas de Quinoa

Fuente:

<https://agroempresario.com/publicacion/24574/quinoa-caracteristicas-cultivo-y-cuidados/?cat=2310001>



Semillas de quinoa

Fuente:

<https://recetarius.com/receta/quinoa-como-cocinarla-correctamente/>

9.3. *Morinda citrifolia* L. “Noni” (Rubiaceae).

Morinda citrifolia, llamada comúnmente noni, guanábana cimarrona, fruta del diablo, fruta del paraíso o mora de la India, es una planta arbórea o arbustiva de la familia Rubiaceae. Es originaria del sureste asiático y Australia, y se distribuye pantropicalmente.

Es un arbusto o árbol perennifolio de 3 a 10 m de altura. Las hojas son opuestas, de elípticas a elíptico-ovadas, (20-45 x 7-25 cm) glabras y brillantes, con nervaduras pinnadas muy marcadas. La inflorescencia es una cabeza globosa con entre 75 a 90 pequeñas flores hermafroditas con 5 pétalos blancos y 5 estambres apenas visibles. El fruto múltiple (sincarpo) es de forma ovoide (5-10 x 3-4 cm), carnosos y de color blanco amarillento al madurar, entonces desprende un olor penetrante y desagradable. Las semillas están dotadas de una burbuja de aire lo que favorece su distribución y asegura su viabilidad, aunque hayan permanecido en el agua durante mucho tiempo. Florece y fructifica durante todo el año (Almeida et al., 2019).

Tiene tolerancia a una gran variedad de ecosistemas, condiciones climáticas y tipos de sustratos. Puede habitar bosques, terrenos volcánicos, litorales, zonas áridas o excesivamente húmedas, desde el nivel del mar hasta los 800 metros sobre el nivel del mar, incluso regenerarse rápidamente tras incendios o largos periodos de sequía (Mownika et al., 2020.).

En diferentes regiones forma parte integrante de la dieta nativa, sea cruda o cocinada. Se consumen los brotes tiernos y las semillas tostadas. Las hojas tiernas se consumen como verdura y las maduras como envoltorio de tradicionales platos de pescado y carne. Se elaboran jugos con los frutos de la especie. Además, se elaboran infusiones con los frutos y las hojas secas (Wang et al., 2002).



Imagen de frutos y semillas de Morinda

Fuente: <https://stock.adobe.com/ar/images/noni-or-morinda-citrifolia-fruits-with-half-slice-isolated-on-white-background-rubiaceae-nonigreat-morinda-indian-mulberry-beach-mulberry-cheese-fruit-gentianales/303855497>



Imagen de Semillas de Morinda

Fuente: <https://es.nicks-asianshop.com/product-page/noni-frucht-morinda-citrifolia>

El noni tiene una larga historia de usos medicinales entre las culturas aborígenes. Los sanadores tradicionales polinesios empleaban todas las partes, las flores, corteza, raíces y especialmente el fruto, para tratar problemas de salud que abarcan desde las aftas hasta el reumatismo. Las lombrices intestinales, la fiebre y las infecciones de la piel eran algunas de las enfermedades más comunes tratadas con esta especie. En otras partes de Asia y el Pacífico, las hojas, flores, frutos y corteza se emplean como tónicos, antipiréticos y descongestivos del tracto respiratorio. El emplasto de las hojas se utiliza en Malasia para la tos, y el zumo de las mismas se aplica como tópico para la artritis en Filipinas (Dixon et al., 1999).

En Occidente se comercializa como suplemento dietario para estos usos medicinales. El extracto alcohólico de hojas tiernas mostró actividad antihelmíntica *in vitro* contra *Ascaris lumbricoides* humano. Ha sido estudiada la actividad como antibiótico de los compuestos extraídos de esta planta. Un extracto de etanol crudo y fracción de hexano de *Morinda citrifolia* mostró una pronunciada actividad antituberculosa. Se ha señalado que podría tener algún efecto neuro protector, regulando neurotransmisores como la noradrenalina, serotonina y norepinefrina. No obstante, el empleo tradicional de *Morinda citrifolia* está limitada a estudios preclínicos farmacológicos y las investigaciones toxicológicas que respaldan la seguridad de su consumo son aún insuficientes (Chan-Blanco et al., 2006.). El material fue donado por el Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, ubicado en el paraje La Coronela, La Lisa, La Habana, Cuba.

9.4. *Moringa oleifera* Lam. “Moringa, Paraíso blanco” (Moringaceae).

Moringa oleifera, conocido como “moringa o ben”, es una especie de árbol originario del norte de la India. Pertenece a la familia Moringaceae la que comprende únicamente un género, *Moringa*. Dentro de *Moringa* hay 13 especies, las cuales abarcan una gama muy diversa de hábitos o formas de crecimiento, desde hierbas y arbustos hasta árboles grandes (Olson et al; 2011).

Moringa oleifera es un árbol caducifolio. Presenta rápido crecimiento, unos 3 m en su primer año pudiendo llegar a 5 m en condiciones ideales; adulto llega a los 10 o 12 m de altura máxima. Tiene ramas colgantes quebradizas, con corteza suberosa, hojas color verde claro, compuestas, tripinadas, de 30 a 60 cm de largo, con muchos folíolos pequeños de 1,3 a 2 cm de largo por 0,6 a 0,3 cm de ancho. Florece a los siete meses de su plantación. Las flores son fragantes, de color blanco o blanco crema, de 2,5 cm de diámetro. Produce vainas colgantes color marrón, triangulares, de 30 a 120 cm de largo por 1,8 cm de ancho, divididas longitudinalmente en 3 partes cuando se secan; cada una contiene aproximadamente veinte semillas incrustadas en la médula (Moyo Busani et al., 2011).



Imagen del árbol de moringa

Fuente:
https://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Moringa_oleifera.htm

Las semillas se caracterizan por presentar 3 alas longitudinales con lo cual es muy fácil la identificación de una semilla de moringa. Son de color marrón oscuro. Su rusticidad las hace muy fácil de cultivar. Las semillas suelen presentar un peso medio de 0.3366 ± 0.06 gramos, un largo de 11.38 ± 1.35 mm, un diámetro de 10.26 ± 0.99 mm y alrededor de 3.002 ± 30 semillas por kilogramo de peso. El núcleo de la semilla contiene 38,4 g de proteína cruda y 34,7% de aceite graso. El aceite extraído de sus semillas tiene muchas aplicaciones. Más de la tercera parte del contenido de las semillas es aceite de alta calidad, rico en ácidos grasos insaturados. En agricultura, las hojas son útiles como abono y como fungicida contra los hongos que atacan las raíces. Por su alto contenido de aminoácidos esenciales entre otros nutrientes hay quien lo considera un superalimento humano (Noruega et al., 2018).

Dentro de las propiedades referidas en la medicina tradicional y naturista, se destacan la hepatoprotectora, hipolipemiente, antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria,

antimicrobiana, antiasmático, antianémica, antihipertensivo, homeostático, desintoxicante, como suplemento dietario, para el tratamiento del agua, como estimulador del crecimiento del pelo; y también para mejorar ciertas funciones mentales como la memoria y la capacidad de aprendizaje (Borgonsoli, 2021). El material fue donado por el Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, ubicado en el paraje La Coronela, La Lisa, La Habana, Cuba.

9.5. *Geoffroea decorticans* (Gillis ex Hook. & Arn.) Burkart “Chañar” (Fabaceae).

El chañar también llamado sofaique es un árbol caducifolio, de corteza verde amarillenta, y con un fruto dulce y comestible. Su madera medianamente pesada es apta para carpintería, para carbón y leña. Tiene un fuste erguido cuando crece aislado, pero es arbustivo cuando crece en bosquecillos. Llega de 3 a 10 m de altura con un tronco que puede superar los 40 cm de diámetro, la corteza se desprende longitudinalmente en fajas irregulares por debajo de las cuales aparece la nueva corteza verde. El follaje es abundante y de color verdoso. El enramado del chañar es cuantioso termina en agudas espinas que desaparecen en su mayoría en septiembre durante la floración, en conjunto con el follaje, proporciona una imagen redondeada a la copa del árbol. Los pétalos de la flor del chañar están pigmentados por un amarillo intenso (Giménez, 2009).

El fruto es una legumbre drupácea, muy carnosa, dulce y comestible. El mesocarpo es pastoso, abundante y dulce, constituido principalmente por disacáridos (≈30%). El endocarpo es leñoso, rugoso y blanquecino y posee un alto contenido lignocelulósico (97%).

Cada fruto presenta semillas con superficie ondulada. El chañar florece de septiembre a octubre y fructifica de noviembre a enero y los frutos se colectan entre enero y marzo. En algunas provincias argentinas y en la región chilena de Atacama, se utiliza para hacer el arrope de chañar. Los frutos se utilizan muy comúnmente tanto para fines culinarios y medicinales en forma procesada de arrope de Chañar.



Imagen de los frutos de Chañar

Fuente:

https://es.wikipedia.org/wiki/Geoffroea_decorticans#/media/Archivo:Feria_vacaciones_tercera_edad_Sernatur_20190412_10.jpg



Imagen de semillas de Chañar

Fuente: <https://pumakawa.org/producto/semillas-de-chañar/>

Extremadamente dulce, oscuro y espeso, es muy similar a la miel o melaza vegetal y se utiliza en su lugar (Saur Palmieri et al., 2019). En la medicina tradicional, el chañar se emplea en el tratamiento de afecciones respiratorias, pero también se le atribuyen propiedades emolientes, antihemorroidales, antihemorrágicas y contraceptivas.

El chañar es excelente para la tos, recomendado para catarrros crónicos, catarrros de fumadores, de asmáticos, bronquitis, etc (Echeverría et al., 2020).

El material fue donado por el INFAP-CONICET- UNSL.

9.6. *Salvia hispanica* L. “Chía” (Lamiaceae).

Salvia hispanica, de nombre común chía, es una planta herbácea de la familia Lamiaceae. Es nativa del centro y sur de México, El Salvador, Guatemala, Nicaragua y Costa Rica. Junto con el lino (*Linum usitatissimum*), es una de las especies vegetales con la mayor concentración de ácido graso α -linolénico omega 3. Se cultiva por ello para aprovechar sus semillas, que se utilizan como alimento. No hay evidencia hasta la fecha de que el consumo de las semillas tenga efectos adversos o interacciones con fármacos (Hernández-Gómez et al., 2008).

Es una planta herbácea anual de hasta 1 m de altura y presenta hojas opuestas de 4-8 cm de largo por 3-5 cm de ancho. Las flores son hermafroditas, entre púrpuras y blancas, y brotan en ramilletes terminales. Las flores dan lugar a un fruto en forma de aquenio indehiscente cuya semilla es rica en mucílago, fécula y aceite. Dicha semilla mide unos 2 mm de largo por 1,5 mm de ancho, 1 mm de alto y es ovalada y lustrosa, de color pardo-grisáceo a rojizo. La semilla de chía contiene muchos nutrientes como, proteínas, calcio, boro (mineral que ayuda a fijar el calcio de los huesos), potasio, hierro, ácidos grasos como omega 3, antioxidantes, y también, oligoelementos tales como el magnesio, manganeso, cobre, zinc y vitaminas como la niacina entre otras. Además, contiene alrededor de 40% de carbohidratos; de estos, 30% es fibra insoluble, 3% es fibra soluble y el resto son almidones esenciales (Di Sapio et al., 2012):



Imagen de semillas de Chía

Fuente: <https://almacencamposverdes.com.ar/semillas-de-chia-beneficios-propiedades-y-usos/>



Imagen plantas de Chía

Fuente: <https://www.ecologiaverde.com/salvia-propiedades-para-que-sirve-y-contraindicaciones-3864.html>

En comparación con otros alimentos tiene dos veces más proteínas que cualquier semilla, cinco veces más calcio que la leche entera, dos veces la cantidad de potasio en los plátanos, tres veces más antioxidantes que los arándanos, tres veces más hierro que las espinacas y siete veces más omega 3 que el salmón (de Souza Ferreira et al., 2015).

Antes de la conquista de América, la chía era un alimento básico para las civilizaciones de México; su cultivo era probablemente el tercero en importancia económica, superado solo por el “maíz” y el “frijol” (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae). Su consumo se relaciona con la pérdida de peso en el ser humano y desde tiempos prehispánicos se requería como pago de tributo a los pueblos conquistadores. Sus semillas se usaban como revitalizante para los combatientes que partían a la guerra y para las mujeres que se preparaban para el parto (Cisternas et al., 2022).

El expeller fue donado por la empresa Greemborg S.A., de la localidad de Lincoln, provincia de Buenos Aires .

9.7. *Solanum tuberosum* L. “Papa, Patata” (Solanaceae).

Es una especie herbácea de nombre común papa o patata, perteneciente al género *Solanum* de la familia de las Solanaceae, originaria de la región que comprende el altiplano sur del Perú y el noroccidente de Bolivia. Fue domesticada en el altiplano andino y en las cercanías del lago Titicaca por los habitantes de esta región desde hace unos 8000 años. En el siglo XVI comenzó a ser trasladada a Europa por los conquistadores españoles quienes la consideraban una curiosidad botánica y no una planta alimenticia. Su consumo fue creciendo, aunque al principio como planta forrajera y de jardín por sus flores; su uso gastronómico se expandió a todo el mundo desde el siglo XVIII, hasta convertirse en uno de los principales alimentos del ser humano (Rodríguez 2010).

Solanum tuberosum es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia (ya que pierde sus hojas y



Imagen del tubérculo de papa

Fuente: <https://revistacitylife.com/comida/papa-blanca-la-papa-mas-popular-y-conocida/>



Imagen de planta de papa

Fuente: <https://www.bioenciclopedia.com/patata-390.html>

tallos aéreos en la estación fría), de tallo erecto o semidecumbente, que puede medir hasta 1 m de altura.

Presentan tres tipos de tallos, uno aéreo, circular o angular en sección transversal, sobre el cual se disponen las hojas compuestas y dos tipos de tallos subterráneos, los rizomas y los tubérculos. Los tubérculos de la papa están engrosados como una adaptación para funcionar como órgano de almacenamiento de nutrientes. Los tubérculos pueden presentar una forma alargada, redondeada u oblonga; y su color, puede ser blanco o amarillo (pulpa), violeta, café o rojizo (la cáscara). Los tubérculos que afloran a ras del suelo adquieren un color verdoso en la parte donde reciben la luz solar por la acumulación superficial de clorofila, al igual que las hojas y tallos. La parte verde de la papa expuesta a los rayos solares debe eliminarse en la preparación como alimento, debido a su toxicidad (Jerez Mompies & Martín Martín, 2012).

En la medicina tradicional se le han empezado a atribuir ciertos efectos antibacterianos, anti hipertensivos y/o anti hemoaglutinantes, en diferentes extractos de esta planta

El material fue comprado en diferentes verdulerías de la ciudad de La Plata.

9.8. *Capsicum annuum* L. “Pimiento, Aji” (Solanaceae).

Comúnmente conocido como “pimiento, chile, ají dulce, pimentón o morrón” de la familia Solanaceae. Se trata de una especie herbácea perenne, suele cultivarse como anual, de porte arbustivo alcanza entre 80 y 100 cm de alto. La raíz del pimiento es voluminosa y profunda, formada por una raíz principal pivotante, aunque en terrenos apelmazados o en suelos de textura pesada tiene escaso desarrollo. Dispone, asimismo, de numerosas raíces adventicias que en horizontal llegan a alcanzar 0,5 o incluso 1 m de longitud. De tallos glabrescentes ramificados con hojas aovadas, pecioladas, solitarias o por pares, de 4-12 cm por 1,5-4 cm de ancho, también pubescentes, con márgenes enteros, base estrechada y ápice algo acuminado. Las flores pueden ser solitarias o formar grupos de muy



Imagen de semillas de morrón amarillo

Fuente:
<https://comunidad.todocomercioexterior.com.ec/profiles/blogs/clasificacion-arancelaria-semilla-de-pimiento>

escaso número, erectas o algo péndulas y nacen en la axila de las hojas con el tallo. El cáliz, persistente, es acampanado y entero, con 5-7 costillas principales redondeadas terminadas en un diente, generalmente romo, y unas cuantas costillas secundarias. Las anteras son generalmente purpúreas. El fruto de forma y tamaño variables, es una baya hueca con 2-4 tabiques incompletos donde se alojan, muy comprimidas, las semillas, de color amarillento y forma discoidal de 3-5 mm (Sarabia, 2015; Hasan et al., 2014).

Las semillas del morrón son redondeadas, de color amarillo pálido, ligeramente reniformes, de unos 3-5 mm. de longitud y están insertas en una placenta cónica de disposición central. En 1g de semillas puede haber entre 150 y 200 semillas y su poder germinativo es de 3-4 años. (Martínez-Sánchez et al., 2010).

Esta especie es originaria de Mesoamérica, donde fue domesticada hace más de 6000 años, y donde se encuentran aún variedades silvestres, como la conocida popularmente como “*chiltepín*, *chile soltero* o *chile loco*”. Se han hallado usos ancestrales del morrón o pimiento, referidos a aliviar dolores inflamatorios, mejorar la salud ocular y fortalecer las defensas del organismo (Pereira et al., 2011).

El material fue comprado en diferentes verdulerías de la ciudad de La Plata.

10. Objetivos generales.

El hallazgo de moléculas naturales y altamente estables con actividad antimicrobiana, antioxidante y/o anticoagulante, entre otras, confiere características apreciables para la ciencia en general, pero en particular para la biotecnología, la farmacia y la biomedicina, debido a que la combinación de estas características no suele hallarse en una única y sola biomolécula

La búsqueda mediante un tamizaje general de actividades biológicas seleccionadas en base a estudios previos referidos a la presencia de principios activos de interés biotecnológico o por la abundancia de inhibidores de proteasas reportados en esas plantas o familias de ellas, será propicia como inicio de esta investigación. En variados reportes bibliográficos, se ha observado que los IPPs de plantas son moléculas altamente estables y potentes inhibidores del crecimiento de bacterias, hongos, e incluso ciertos virus; así como biomoléculas que presentan actividades anticoagulante, antioxidante, etc.

Por tal motivo, el objetivo principal de este trabajo es caracterizar bioquímica y biológicamente nuevos extractos proteicos vegetales (EPV) provenientes de plantas alimentarias, para la evaluación de sus potenciales aplicaciones como agentes antimicrobianos naturales, anticoagulantes, hipoglucemiantes y antioxidantes. Finalmente se estudiarán los IPPs más relevantes, que mantengan dichas actividades y que adicionalmente exhiban alta estabilidad térmica y a pH extremos, a fin de subrayar también la importancia de esta estabilidad fisicoquímica para la posible aplicación de esos compuestos en biomedicina, agricultura y/o la industria alimentaria.

11. Objetivos específicos

1. Obtener los extractos vegetales (EPVs) de semillas de canola, chañar, moringa, morinda, morrón amarillo, quinoa, chía, y tubérculos de papa.
2. Determinar la actividad antioxidante e hipoglucemiante de los EPVs.
3. Estudiar las propiedades antimicrobianas de los EPVs mediante el uso de bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *E. faecalis*) y Gram negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*), y de especies del género *Candida*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula*.
4. Efectuar testeos de la actividad de los EPVs sobre cepas bacterianas con mecanismo de resistencia inducibles (*K. pneumoniae* BLEE+ y *A. baumannii* carbapenemasas+).
5. Identificar, purificar y caracterizar los inhibidores de proteasas presentes en los EPVs, relacionados a las actividades biológicas ensayadas.
6. Purificar los IPPs de los EPVs más promisorios empleando técnicas de exclusión molecular y cromatografía de afinidad.
7. Analizar los IPPs más promisorios mediante electroforesis y espectrometría de masas.
8. Caracterizar los IPPs mediante cinética de inhibición para el cálculo de parámetros cinéticos (K_i , IC_{50}).
9. Estudiar la actividad anticoagulante de los IPPs sobre ambas vías de coagulación (intrínseca y extrínseca).
10. Estudiar la potencial actividad hipoglucemiante de los IPPs.
11. Estudiar la actividad antioxidante de los IPPs.
12. Identificar y caracterizar los péptidos nativos (no inhibidores de proteasas) con actividad antioxidante y anticoagulante de semillas de chañar

CAPÍTULO 2

**Extracción, estudio y parcial
caracterización biológica de los
materiales vegetales seleccionados.**

Las plantas han sido bien documentadas por sus usos medicinales durante miles de años y las medicinas tradicionales siguen siendo una parte importante de los tratamientos habituales de diferentes enfermedades en diferentes partes del mundo. En los últimos años ha crecido el interés por las terapias alternativas y el uso terapéutico de productos naturales, especialmente los derivados de plantas, ellas son consideradas como una de las principales fuentes de materiales biológicamente activos. El tamizaje fitoquímico de plantas medicinales ha contribuido en gran medida al descubrimiento de nuevos fármacos. Varias plantas medicinales se han sometido a investigaciones químicas detalladas y esto ha llevado al aislamiento de moléculas bioactivas puras que se han evaluado farmacológicamente. Como resultado, se han descubierto nuevos fármacos y nuevas aplicaciones. Las plantas seleccionadas en esta tesis presentan características interesantes para la evaluación de potenciales actividades biológicas. Al ser plantas de uso y consumo humano desde tiempos ancestrales, pueden esperarse altos niveles de tolerancia a sus componentes, presuponiendo la aparición de menor cantidad de reacciones adversas para las futuras y potenciales aplicaciones biomédicas y/o agroalimentarias que surjan a partir de los extractos analizados, ya sea como mezcla compleja de metabolitos o como moléculas parcialmente puras.

1. Metodología.

1.1. Obtención de los EPVs.

De cada especie vegetal seleccionada, se prepararon dos tipos de extractos diferentes. Los materiales utilizados para realizar los extractos fueron las semillas de ají, quinoa, moringa, chañar y noni, los expellers, productos de la extracción industrial por prensado, de aceite de canola y chía y porciones del tubérculo de papa pelados y congelados (Ver anexo I).

- Preparación de los Extractos crudos (EC).

El material de cada especie fue pesado y secado a temperatura ambiente por 16 a 20 h. El material seco fue triturado de manera discontinua en multiprocesadora con el agregado de 100 mL de buffer fosfato 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,4 a 4 °C. Posteriormente se incubó el material procesado por 3 h a 4 °C. Luego el material fue filtrado con gasa y centrifugado por 30 min a 4 °C y 6000 g Finalmente fue colectado el sobrenadante y se obtuvo el EVPs correspondiente a cada especie.

- Preparación de los Extractos Tratamientos Térmicos (TT).

A cada EC se le aplicó tratamiento térmico mediante calentamiento a 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C y 100 °C durante 5 minutos. Posteriormente fueron enfriados a temperatura ambiente y centrifugados a 6000 g. El sobrenadante obtenido fue analizado para verificar la presencia de actividad biológica.

Las metodologías específicas aplicadas para la obtención del EC de cada especie, se presenta en el Anexo I.

1.2. Cuantificación de proteínas de los EPVs.

1.2.1. Estimación del contenido proteico por el método de Bradford (1976).

La estimación del contenido proteico se realizó por el método de Bradford (1976). Este método se basa en la unión del colorante Coomassie Blue G-250 a las proteínas (Ver Anexo II). Dicha unión produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma marrón del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). El método resulta especialmente apto para la valoración de proteínas en extractos vegetales, que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con el tradicional método de Lowry (Lowry et al., 1951).

1.2.2. Estimación del contenido proteico por el método de Lowry (1951).

La estimación del contenido proteico se realizó por el método Lowry (1951), método colorimétrico de sensibilidad moderadamente constante de proteína en proteína; ampliamente utilizado por ser muy sensible y altamente reproducible. Al igual que el método de Bradford, esta metodología de determinación de la concentración de proteínas es destructiva, ya que, una vez llevado a cabo el procedimiento la muestra no puede volver a utilizarse, sino que se descarta.

La descripción de la técnica se muestra en el Anexo II.

1.3. Investigación de actividad inhibitoria de proteasas de los EPVs.

Las enzimas se encuentran divididas en siete clases: (1) Oxido-reductasas, (2) Transferasas, (3) Hidrolasas, (4) Liasas, (5) Isomerasas, (6) Ligasas y (7) Translocasas. Dentro de las hidrolasas, se hallan las proteasas que catalizan la degradación de proteínas mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos. Dependiendo de la localización del sitio de clivaje, las proteasas pueden ser clasificadas como endoproteasas o exoproteasas. Las primeras hidrolizan enlaces amídicos dentro de la secuencia de una proteína, mientras que las exoproteasas degradan las uniones peptídicas desde el extremo N-terminal o el C-terminal de una proteína, y son denominadas aminopeptidasas y carboxipeptidasas, respectivamente. El mecanismo de clivaje es a través de un ataque nucleofílico y subsecuente hidrólisis del intermediario tetraédrico (Rawlings et al., 2018).

Las proteasas, a su vez, se encuentran agrupadas de acuerdo al aminoácido o grupo involucrado en su sitio activo: serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), aspartato (Asp), glutamato (Glu), o un átomo metálico en metaloproteasas. Los inhibidores de proteasas suelen ser clasificados en función del tipo de proteasa que inhiban.

Para el tamizaje preliminar de actividad inhibitoria de proteasas se utilizan como enzimas blancos a: tripsina (proteasa serínica) y papaína (proteasa cisteínica).

1.3.1. Determinación de actividad inhibitoria de tripsina.

Con el objetivo de poder determinar si en un EPV existe alguna molécula con la capacidad de inhibir la actividad de la endoproteasa tripsina, se realiza en primera instancia y como control positivo de la reacción, una técnica cinética capaz de evidenciar la actividad de dicha enzima. Para ello, la actividad de tripsina fue determinada por el incremento en la absorbancia a 410 nm producto de la hidrólisis del sustrato sintético BApNA (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida), mediante lecturas en intervalos de 30 seg durante 10 min a 37

°C. Los volúmenes fueron adaptados para la lectura en placa de 96 pocillos (Lector de placas Tecan Infinite 200 Pro) en un volumen final de 200 µl.

La inhibición de la actividad de tripsina causó disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato, lo cual se tradujo en la atenuación de la pendiente de hidrólisis. Se determinaron los blancos de enzima y sustrato. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, con la estimación de la desviación estándar correspondiente.

Tabla 1: Preparación para medir la actividad de tripsina.

Mezcla de reacción de actividad de tripsina	
Buffer Tris-HCl, CaCl ₂ 50 mM, pH 8	160 µl
Tripsina 2,8x10 ⁻⁷ M, Sigma	10 µl
Muestra	20 µl
Incubación de 15 min a	37 °C
BAPNA 20 mM, Sigma	10 µl

La concentración de cada muestra (EPV) fue de 200 µg/mL.

1.3.2. Determinación de actividad inhibitoria de papaína.

La actividad de papaína fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm producto de la hidrólisis del sustrato PFLNA (L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-p-nitroanilida), mediante medidas continuas durante 10 min a 37 °C (Obregón et al., 2015). Los volúmenes fueron adaptados para la lectura en placa de 96 pocillos (Lector de placas Tecan Infinite 200 Pro) en un volumen final de 200 µl (Tabla 2).

La inhibición de la actividad de papaína produjo disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato, lo cual se tradujo en la atenuación de la pendiente de hidrólisis. Se determinaron los blancos de enzima y sustrato. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, con la estimación de la desviación estándar correspondiente.

Tabla 2: Preparación de la reacción para medir actividad inhibitoria de Papaína.

Mezcla de reacción de actividad de papaina	
Buffer fosfato 0,1 M, KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM, Cys 3 mM, pH 6,5	160 µl
Papaína 4,5x10 ⁻⁸ M, Roche	10 µl
Muestra	20 µl
Incubación de 15 min a	37 °C
BAPNA 1 mM, Sigma	10 µl

Ya sea para medir la actividad inhibitoria sobre Tripsina o Papaína, se estimó dicha actividad, de la siguiente manera:

La actividad inhibitoria fue definida como la actividad proteolítica residual en presencia de inhibidor y expresada como porcentaje de inhibición (%), respecto del ensayo control (donde el volumen de muestra se reemplazó por el buffer correspondiente), utilizando la siguiente ecuación:

$$I (\%) = \frac{(T - T^*)}{T} \times 100$$

Donde T* y T son las respectivas actividades de proteasa con y sin inhibidor.

1.4. Método para concentración de proteínas: Liofilización.

La liofilización es un proceso que consiste en deshidratar un producto previamente congelado, y posterior sublimación del hielo a presión reducida gracias a condiciones de vacío y baja temperatura. Este proceso evita la desnaturalización de las proteínas y permite obtener un producto seco, esponjoso, de mayor estabilidad y fácil disolución en agua. El proceso se realiza a temperaturas inferiores a la de solidificación total, por lo tanto, el producto debe estar congelado a temperaturas entre 10 y 15 °C por debajo de su temperatura eutéctica (temperatura más baja a la cual es posible encontrar una fase líquida) para evitar la formación de cristales de H₂O. Se coloca el producto en un contenedor o cámara hermética y se procede a realizar vacío en la misma hasta alcanzar una presión por debajo de la presión de vapor correspondiente al hielo a la temperatura de congelamiento. Manteniendo siempre el producto por debajo de la temperatura eutéctica, se produce la sublimación del hielo. Los

vapores producidos en la sublimación son retenidos en un condensador que se encuentra a una temperatura inferior a la del producto congelado. Cuando todo el hielo es eliminado, se dice que el secado primario ha sido terminado. Finalizado el proceso el producto debe almacenarse en un contenedor hermético ya que por su estado es ávido de captar humedad ambiente.

Ventajas de la técnica de liofilización.

- La temperatura a la que es sometido el producto, se encuentra por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.
- Debido a la baja temperatura a la que se opera, la pérdida de los constituyentes volátiles es mínima, se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.
- Se eliminan los fenómenos de oxidación, dado que se opera y envasa a alto vacío.
- La gran porosidad del producto facilita la reconstitución con rapidez por la adición de agua o del solvente adecuado.
- Al ser despreciable la humedad remanente, el producto puede ser almacenado por mucho tiempo (dependiendo de las características de cada producto), constituyendo productos de larga estabilidad.

1.5. Electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ion de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida comparado con el caso del clásico buffer tris-glicina. Para alcanzar una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa, se emplea un sistema de dos geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T y 3% C), y un gel de resolución (16.5% T y 3% C). Otra ventaja de este sistema, si se lo desea emplear como purificación previa al microsecuenciamiento, es que la omisión de glicina previene interferencias.

La descripción de la técnica completa se detalla en el Anexo III.

1.6. Evaluación de actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se define como la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres.

En esta tesis se evaluará la capacidad antioxidante de los EPVs mediante el ensayo del ABTS (Pukalskas et al., 2002).

- **Método de ABTS.**

Se basa en la activación del radical $ABTS^{\bullet+}$ con $K_2S_2O_8$ y posterior incubación con los EPVs antioxidantes y lectura de absorbancia a longitud de onda adecuada. El mediador químico ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico, Ref: A-1888, Sigma-Aldrich), cuyo radical ácido $ABTS^{\bullet+}$ es un poderoso agente oxidante que, por reacción con determinadas moléculas antioxidantes, sufre una reducción de su coloración azul-verdosa; cuya absorbancia puede ser detectada a 734 nm.

La técnica se realizará mediante lecturas a 734 nm previa incubación de los EPVs con la solución inicial de ABTS (preparada el día anterior con agregado de persulfato de potasio y disuelta en agua).

Tal como se observa la Tabla 3, la adición del persulfato de potasio se realiza para activar al radical ABTS. Luego se cubre el tubo Falcon entero con papel aluminio para evitar la exposición del reactivo a la luz y se lo deja incubando durante toda la noche a temperatura ambiente.

Tabla 3: Preparación del reactivo ABTS para poder utilizarlo para las medidas de actividad antioxidante.

Preparación del reactivo abts.	
ABTS, Sigma	0,0388 g
K ₂ S ₂ O ₈	0,0066 g
AD c.s.p.	10 ml

Se mezcla por inmersión y se incuba en oscuridad a 25 °C toda la noche.

Finalmente se lleva el reactivo a un valor de Absorbancia 734 nm = $1 \pm 0,01$ con buffer fosfato 50 mM pH 7,4.

Para iniciar la medición, el ABTS diluido obtenido se llevó a un valor de absorbancia igual a $1,00 \pm 0,01$ con buffer fosfato 50 mM pH 7,4. Se utilizaron diferentes concentraciones de EPVs, con el objetivo de analizar el efecto de la concentración del mismo sobre su actividad antioxidante frente al sustrato ABTS diluido. Los volúmenes fueron adaptados para la lectura en placa de 96 pocillos (Lector de placas Tecan Infinite M200 Pro) en un volumen final de 200 μ l. A su vez, para cada concentración se realizó un control con agua destilada estéril. Luego de colocar la muestra (o control) y el reactivo, se incubó la placa en oscuridad por 20 minutos a 25°C. Transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia a 734 nm. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, con la estimación de la desviación estándar correspondiente.

El porcentaje de actividad antioxidante para cada volumen de muestra se definió como el resultado de:

$$(\%) \text{ Actividad en Eliminación de Radicales ABTS} = 100 - 100 \times \left(\frac{A1 - A2}{A0} \right)$$

Donde A0 es la absorbancia del control sin muestra y A1 es la absorbancia en presencia de la muestra y ABTS+. A2 corresponde al valor de absorbancia de la muestra en blanco sin ABTS+.

1.7. Evaluación de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

Actividad inhibitoria de α -glucosidasa: Se realizará el ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa de acuerdo con el método de (Yu et al., 2011) y el método de (Kim et al., 2004), con ligeras modificaciones. La α -glucosidasa hidroliza el sustrato p- nitrofenil glucopiranosido (pNPG) liberando p-nitrofenol cuya absorbancia puede medirse a 410 nm. La IC₅₀ se define como la concentración de péptido que inhibe el 50 % de la actividad α -glucosidasa bajo las condiciones del ensayo.

El ensayo de actividad inhibitoria de α -glucosidasa se realizó adaptado a una placa de 96 pocillos (Lector de placas TecanInfiniteM200 Pro) en un volumen final de 150 μ l, usando el sustrato 4-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (pNPG). Se pre incubó una cantidad fija de 10 μ l de α -glucosidasa (0,5 U/mL) con diferentes concentraciones de EPVs en buffer fosfato de sodio 0,01 M (pH 7,4). Luego de 10 min de pre-incubación a 37 °C, se agregaron 10 μ l del sustrato pNPG 5mM a la mezcla de reacción. La hidrólisis del pNPG fue determinada a través del incremento de la absorbancia a 405 nm, tomando medidas cada 1

min durante 20 min y manteniendo la temperatura a 37 °C. Las medidas se realizaron por triplicado y se incluyeron los blancos apropiados correspondientes a H₂O destilada estéril y, además, se incluyó un control de concentración de sales (control NaCl 25 mM), con el objetivo de probar que la inhibición de la actividad de la enzima α-glucosidasa por parte de los EPVs se debía exclusivamente a la presencia de inhibidores en la muestra y no a las sales presentes en la misma.

El porcentaje de actividad hipoglucemiante o inhibitoria de α-glucosidasa se definió como el resultado de:

$$(\%) \text{ Actividad Inhibitoria } \alpha\text{-Glucosidasa} = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia 405nm promedio muestra}}{\text{Absorbancia 405nm promedio blanco H}_2\text{O}} \right) \times 100$$

1.8. Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana.

La optimización y adecuación de técnicas de sensibilidad a antimicrobianos de bacterias patógenas de importancia en salud humana son importantes para el diagnóstico adecuado y preciso. En este trabajo de tesis doctoral se buscó optimizar la búsqueda de parámetros técnicos y de inhibición, con el fin de mejorar el estudio y el tamizaje de las actividades antibacterianas. Estas técnicas fueron el puntapié inicial para el inicio de estas investigaciones en nuestro grupo de trabajo. La puesta a punto y su transferencia quedarán disponibles para futuros estudios en nuestro Centro de Investigación.

Se realizó un tamizaje de actividad antimicrobiana evaluando la actividad inhibidora del crecimiento bacteriano frente a EC y los TT de los EPVs seleccionados.

1.8.1. Determinación de la capacidad inhibitoria del crecimiento en medio de cultivo sólido.

Se realizó el ensayo de difusión en agar para determinar la capacidad inhibitoria en el crecimiento de diversas cepas bacterianas ATCC:

<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC29213
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC35218
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853

Para ello, se preparó un preinóculo en solución fisiológica a partir de colonias previamente crecidas a 37 °C durante 18–24 h, ajustando la turbidez al 0,5 de la escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) con nefelómetro digital (Becton Dickinson, BD). Los inóculos se sembraron con hisopo sobre placas de agar Müller Hinton de espesor de 5 mm descargando dicho hisopo en toda la superficie de la placa en tres direcciones. Posteriormente se inocularon con 5 gotas de 4mm de diámetro en las que se colocaron 20 µL de las soluciones de los diferentes extractos a ensayar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y a continuación se registraron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (en milímetros). Composición del medio Müller-Hinton (MH) por volumen final de litro.

Tabla 4: Composición del medio de cultivo MH, Britania.

Composición del medio Müller-Hinton (MH) por volumen final de litro.	
Infusión de carne	300 g
Peptona ácida de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	15.0 g
	pH FINAL: 7.3 ± 0.1

Se trata de un medio utilizado para las pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos, debido a su concentración levemente más baja de Agar Agar, lo que permite una mejor difusión de las moléculas. Se han seleccionado este medio, para la estandarización de los halos de inhibición en las pruebas de sensibilidad.

1.8.2. Determinación de la capacidad inhibitoria del crecimiento en medio de cultivo líquido.

La determinación de la capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano en medio líquido se desarrolló bajo un mismo protocolo, del cual se pueden obtener visualizaciones e interpretación de resultados a través de mediciones diferentes.

1.8.2.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los EPVs, en caldo de cultivo por medio de la medición de la Absorbancia.

Para realizar esta determinación se prepararon suspensiones bacterianas normalizadas con el uso de nefelómetro comercial BD, en 0,5 Mc Farland. Los cultivos provinieron de repiques frescos de 24 h.

Una vez preparadas las suspensiones bacterianas se realizaron las mezclas de cultivo en microplaca de ELISA de 96 pocillos con los siguientes volúmenes:

- 100 µl de caldo Müller Hilton.
- 100 µl de (H₂O destilada).
- 100 µl del EPV esterilizado por filtración.
- 10 µl de suspensión bacteriana.

Una vez preparadas las mezclas en las microplacas se dejan incubar por 20 h. a 37 °C y en agitación en bandeja a 120 rpm.

Posteriormente se leyó la absorbancia a 630nm en Lector de placas Tecan Infinite M200 Pro, a tiempos 0 y 20 h.

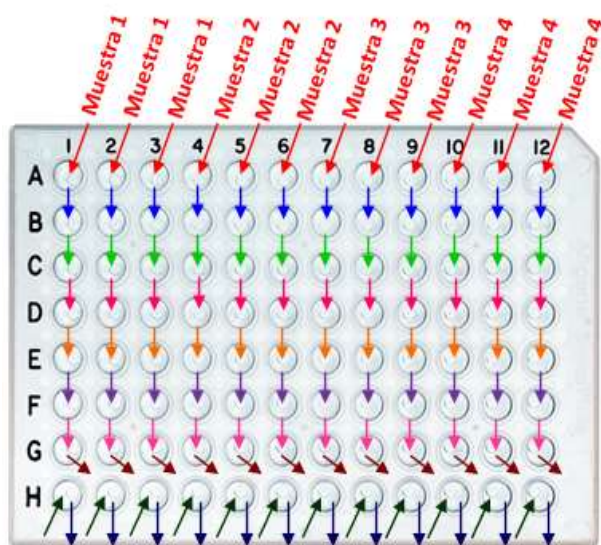
Preparación de muestra: Se filtra la muestra (utilizando jeringa de 10 mL) en primera instancia con filtro de 0,8 µm y luego, en esterilidad, con filtro de 0,22 µm. Colectar en eppendorf de 2mL estéril.

Preparación de microorganismos:

1. Partiendo de un stock glicerinado, hacer repique en placa con agar (SB) Dejar crecer a 36-37°C por 12h.
2. Realizar diluciones al 0,5 de Mc Farland usando hisopos estériles y sc. fisiológica estéril.

Procedimiento:

1. Colocar el caldo MH (autoclavado) en un recipiente estéril.
2. Seguir los pasos que se describen en el siguiente esquema



- 1) Colocar 100 µl de caldo MH en TODOS los pocillos (P-MW)
- 2) Agregar 100 µl de muestra (P-200)
- 3) Pasar 100 µl de la fila A a la fila B (P-MW)
- 4) Pasar 100 µl de la fila B a la fila C (P-MW)
- 5) Pasar 100 µl de la fila C a la fila D (P-MW)
- 6) Pasar 100 µl de la fila D a la fila E (P-MW)
- 7) Pasar 100 µl de la fila E a la fila F (P-MW)
- 8) Pasar 100 µl de la fila F a la fila G (P-MW)
- 9) Descartar 100 µl de la fila G (P-MW)
- 10) Colocar 100 µl de Sc. fisiológica en la fila H (P-200)
- 11) Descartar 100 µl de la fila H (P-200/P-MW)
- 12) Agregar 10 µl de Bacteria en TODOS los pocillos (P-20)

Figura 6: Esquema de trabajo para la preparación de la placa en el estudio de la sensibilidad bacteriana a antibióticos en microplaca.

Con este esquema de trabajo se puede calcular la CIM y la CBM. La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución.

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 h de incubación a 37 °C. La CIM se ha establecido como test de referencia frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Andrews, 2001).

La Concentración Bactericida Mínima (CBM), se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 h). En ocasiones se hace necesario determinar la actividad bactericida de un agente antimicrobiano, como es el caso de endocarditis, osteomielitis, meningitis o infecciones en pacientes inmunosuprimidos, por tal motivo, existe la necesidad de establecer métodos de laboratorio que definan la actividad de estos agentes (Wayne, 1999).

1.8.2.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana en caldo (microplaca) utilizando resazurina como indicador de la viabilidad celular.

El ensayo de resazurina en microplaca, se basa en la capacidad del compuesto resazurina (color azul) de reducirse irreversiblemente a la forma resorufina (color rosa), lo cual permite evaluar la viabilidad celular, como se muestra en la fig. 7. (Palomino et. al., 2002).

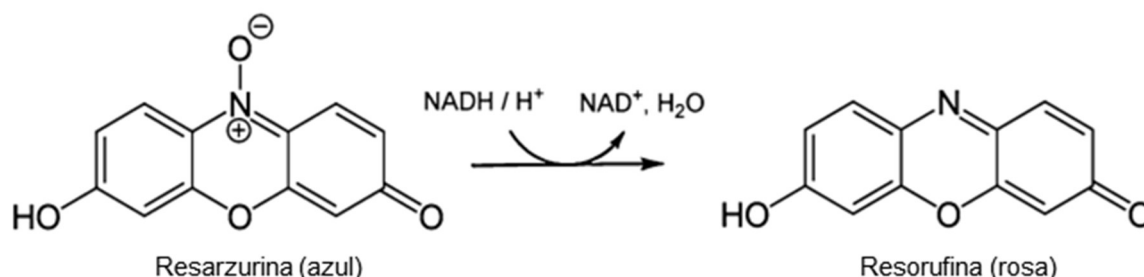


Figura 7. Mecanismo de reducción de la resazurina a resorufina.

Dentro de la célula, la resazurina experimenta una reducción enzimática debido a la actividad de enzimas tales como: flavín mononucleótido deshidrogenasa, flavín adenín dinucleótido deshidrogenasa, nicotinamida adenina deshidrogenasa y citocromos (O'Brien et

al., 2000). Luego, la resorufina es secretada fuera de las células hacia el medio extracelular, lo cual resulta en un visible cambio de color de azul a rosa. Es así como la tasa de reducción basada en el cambio colorimétrico, el cual puede ser cuantificado colorimétricamente o fluorométricamente, refleja el número de células viables.

Se colocaron 100 µl medio nutritivo Müller-Hinton en los pocillos de la placa de 96 pocillos, se agregaron 100 µl de cada EPV a ensayar y 10 µl de inóculo de bacterias (previamente diluido hasta observar turbidez correspondiente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland). Luego de incubar durante 20 h a 37 °C (con agitación), se agregaron 15 µl de resazurina 0,02% en cada pocillo y se incubó la placa durante 1 h a 37 °C y con agitación. Se observó el color en los pocillos de la placa.

1.8.3. Estudio de la actividad de los EPVs sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles.

Pruebas en medio sólido.

Con el objeto de identificar la presencia de algún tipo de inhibición de los sistemas bacterianos inducibles de resistencia enzimática, por parte de alguno de los 16 extractos vegetales disponibles para este trabajo de investigación, se diseñaron protocolos, basados en los lineamientos de red WHONET. De esta manera se probaron los diferentes EPVs, respecto a la capacidad antimicrobiana y a la potencial utilización en reemplazo de los clásicos inhibidores de mecanismos de resistencia inducibles y/o potencial sinergismo con antibióticos de uso comercial.

Para ello se rediseñó un experimento que permitió la obtención e interpretación de dos resultados a través de un único ciclo de cultivos frente a diferentes muestras y antibióticos:

1. Actividad antibacteriana intrínseca de los EPVs sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles, en medio sólido.
2. Determinación del sinergismo de los EPVs con antibióticos comerciales sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles, en medio sólido.

Se diseñó el experimento en base a las recomendaciones estipuladas por la red WHONET, con algunas modificaciones. En este caso, los EPVs se utilizaron reemplazando al ácido clavulánico y al ácido borónico, para la detección de BLEE, y al EDTA, para la detección de carbapenemasas.

Tal como se muestra en la Fig. 2 (Cap 1), los discos deben tener una separación de 25-30 mm de centro a centro. Un agrandamiento o deformación de la zona de inhibición de CTX o CAZ en las proximidades del disco de AMC (efecto “huevo”), confirmaría la presencia

de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en la cepa estudiada. En este caso, se registra el tamaño de la zona de inhibición correspondiente a CTX o CAZ sin considerar la deformación producida por el inhibidor (ác. clavulánico). Asimismo, la red WHONET, recomienda utilizar un disco que contenga Cefoxitina (CFO) como control de calidad de la tipificación y estimación del mecanismo de resistencia. Por otro lado, en la misma placa, se puede diferenciar la presencia de un mecanismo enzimático (AmpC plasmídicas) de resistencia por impermeabilidad, ubicando un disco de Ácido Borónico en medio de un disco de CTX y CFO, en este caso si se observa una deformación del halo de las cefalosporinas se confirmaría la presencia de AmpC plasmídica.

Para determinar este objetivo hemos propuesto el siguiente esquema de trabajo:

Para cepas productoras de BLEE:

- Cada placa se inoculó con una suspensión 0,5 Mc Farland de la bacteria resistente a probar frente a cada EPV. Para la realización de esta prueba se realizó una prueba similar a la realizada en medio de cultivo sólido (ver inciso 1.8.1.), pero en este caso se utilizó cepas de *Klebsiella pneumoniae* (BLEE+).
- Se colocaron los tres discos comerciales de Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX) y Cefoxitina (CFO), formando un triángulo Isósceles, cada uno a 1 cm del borde de la placa.
- En el centro de la placa se sembraron 100 μ L del EPV a testear, sembrando 4 gotas de a 25 μ L y dejándolo secar entre gota y gota para que el área de siembra fuera bien pequeña.
- Se dejó incubar a 37 °C por 24h.
- Se leyeron y fotografiaron directamente los resultados.



Figura 8. Diseño de placa para búsqueda de mecanismos BLEE.

Para cepas productoras de Carbapenemasas,

Cada placa se inoculó con una suspensión 0,5 Mc Farland de la bacteria resistente a probar frente a cada EPV. Para la realización de esta prueba se realizó una prueba similar a la

realizada en medio de cultivo sólido (ver inciso 2.1.1.), pero en este caso se utilizaron cepas conocidas de *Acinetobacter baumannii carbapenemasas* (+).

- Se colocaron los dos discos comerciales de Meropenem (MRP) e Imipenem (IMI), cada uno a 16 mm del centro de la placa.

En el centro de la placa se sembraron 100 μ L del EPV a testear, sembrando 4 gotas de a 25 μ L y dejándolo secar entre gota y gota para que el área de siembra fuera bien pequeña.

- Se dejó incubar a 37 °C por 24h.

- Se leyeron y fotografiaron directamente los resultados.



Figura 9. Diseño de placa para búsqueda de mecanismo Carbapenemasas.

1.8.4. Testeos de la actividad de los EPVs sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles.

Pruebas en medio líquido.

Para la realización del siguiente experimento se utilizaron dos especies representativas de los principales mecanismos de resistencia a antibióticos inducibles seleccionadas para este trabajo.

- *Klebsiella pneumoniae*: con mecanismo de resistencia BLEE. Cepa aislada de un Laboratorio de análisis bacteriológico de la ciudad de La Plata.
- *Acinetobacter baumannii*: con mecanismo Carbapenemasas. Cepa aislada de un Laboratorio de análisis bacteriológico de la ciudad de La Plata.

Este experimento se llevó a cabo en tres etapas, en tres días diferentes y permite la obtención e interpretación de los resultados a través en un único cultivo frente a diferentes muestras y antibióticos:

- Actividad antibacteriana intrínseca de los EPVs sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles, en medio líquido.
- Determinación del sinergismo en la inhibición bacteriana de los EPVs con antibióticos comerciales, sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles, en medio líquido.

Etapas 1. Determinación de la CIM para los diferentes antibióticos de prueba.

Para la determinación de la CIM se realizaron pruebas de crecimiento en microplacas de Elisa, donde realizamos una serie de diluciones de los diferentes antibióticos seleccionados en presencia de una concentración inicial conocida de suspensión bacteriana, de bacterias con diferentes mecanismos de resistencia inducibles (BMRI), (Ver esquema de trabajo de la Figura 8).

Los experimentos se realizaron usando antibióticos provenientes de discos comerciales (Rosco, Dinamarca) para testeos en placas de sensibilidad a antibióticos. En la preparación y armado de los discos se utiliza una fase cerámica que estabiliza al antibiótico aumentando su vida media y posibilitando su conservación seca a temperatura ambiente. Las presentaciones de los discos contienen: Ceftazidima 30ug, Cefotaxima 30ug, Cefoxitina 30ug, Imipenem 10ug, Meropenem 10ug.

La mezcla inicial fue la siguiente:

- 120ul de caldo Müller Hinton
- 20ul ATB (preparada previamente en distintas concentraciones)
- 20ul de suspensión de BMRI en concentración de la escala Mc Farland 0,5.
- 20ul SC fisiológica control

De esta manera, se ha generado un esquema de trabajo donde se investigan las diferentes diluciones de los antibióticos, desde la máxima concentración a la más baja.

El objetivo de determinar la CIM en este experimento, nos permitió conocer la “Concentración mínima de Antibiótico en la cual empieza a visualizarse Crecimiento” (CmCB). De esta manera, se utilizará esta concentración de antibiótico como punto de partida para el uso de los extractos vegetales y verificar que bajo esta concentración mínima de antibiótico y en presencia de extracto, hay inhibición del crecimiento.

Etapla 2. Detección de Actividad Inhibitoria por parte de los EPVs.

Para la determinación de la actividad Inhibitoria de los EPVs, se realizaron pruebas de crecimiento en microplacas de Elisa, donde realizamos una serie de diluciones de los diferentes EPVs seleccionados a la concentración inicial conocida de suspensión bacteriana. La mezcla inicial fue la siguiente:

- 120ul de caldo Müller Hinton
- 20ul EPV (preparada previamente en distintas concentraciones)
- 20ul de suspensión de BMRI en concentración de la escala Mc Farland 0,5.
- 20ul SC fisiológica control

De esta manera, se ha generado un esquema de trabajo donde se investigan las diferentes diluciones del EPV, desde la máxima concentración a la más baja.

El objetivo de determinar la actividad inhibitoria intrínseca de un EPV en este experimento, nos permitió conocer si el EPV tenía fehacientemente una actividad antibacterial contra las bacterias multirresistentes seleccionadas. Y, de ser así, manejar a través de las diluciones al medio de los EPV, alguna idea del rango de concentración, en el cual comienzan a manifestar dicha actividad inhibitoria.

Etapla 3. Determinación de la “CIM aparente” para el EPV

Con la CMBC y los diferentes extractos que mostraron inhibición de los mecanismos inducibles enzimáticos a concentraciones máximas y fijando todas las condiciones del día 2, se evaluó la acción inhibitoria utilizando diluciones seriadas del extracto vegetal. Así, podremos determinar las concentraciones mínimas de extracto a partir de las cuales pueden producir inhibición del mecanismo de resistencia.

Para el paso 3 la mezcla de cultivo la preparamos en microplaca de ELISA con los siguientes volúmenes:

- 140ul de caldo Müller Hinton.
- 20ul del sobrenadante del resuspendido de ATB
- 20ul del EPV esterilizado por filtración.
- 20ul de suspensión bacteriana

En todos los casos se dejan incubar por 20 h a 37 °C y en agitación a 120 rpm. Luego se lee la absorbancia a 630 nm a tiempo 0 y 20 h. Las suspensiones bacterianas que usamos se normalizaron con el uso de nefelómetro comercial BD. En 0,5 Mc Farland, y provinieron de repique de 24 h.

Con la utilización de la CMBC, en el caso de los antibióticos que la tienen y en el caso de los antibióticos que presentan resistencia a la concentración dada por la dilución del disco, y en presencia de los diferentes extractos en sus concentraciones máximas, hemos evaluado si se produce inhibición de crecimiento en estos tipos de bacterias, manifestando su efecto sinérgico con el antibiótico.

De esta manera, se comprobaría que sería posible lograr inhibición bacteriana, en presencia de EPVs, en concentraciones a las cuales el antibiótico no inhibe *per se*.

El protocolo para la preparación de las suspensiones de antibióticos, se describe en el Anexo IV.

Interpretación de los resultados:

Para la evaluación de los resultados obtenidos en las lecturas de las placas, se introdujeron los valores de absorbancia en la ecuación del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano que se muestra a continuación:

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = 100 - 100 \times \frac{(AbsM20 - AbsATB20 - AbsEPV20) - (AbsM0 - AbsATB0 - AbsEPV0)}{(AbsControl20 - AbsControl0)}$$

En donde:

AbsM20: Absorbancia medida a 630 nm luego de 20h de cultivo a 37 °C, en un pocillo donde se colocaron la bacteria, medio de cultivo, antibiótico y EPV.

AbsATB20: Absorbancia medida a 630 nm luego de 20h de cultivo a 37 °C, en un pocillo donde se colocaron la bacteria, medio de cultivo y el antibiótico.

AbsEPV20: Absorbancia medida a 630 nm luego de 20h de cultivo a 37 °C, en un pocillo donde se colocaron la bacteria, medio de cultivo y EPV.

AbsControl20: Absorbancia medida a 630 nm luego de 20h de cultivo a 37 °C, en un pocillo donde se colocaron la bacteria y el medio de cultivo.

AbsMuestra0: Absorbancia medida a 630 nm en las condiciones iniciales de cultivo a 37 °C (a tiempo 0), en un pocillo donde se colocaron la bacteria, medio de cultivo, antibiótico y EPV.

AbsATB0: Absorbancia medida a 630 nm en las condiciones iniciales de cultivo a 37 °C (a tiempo 0), en un pocillo donde se colocaron la bacteria, medio de cultivo y el antibiótico.

AbsEPV0: Absorbancia medida a 630 nm en las condiciones iniciales de cultivo a 37 °C (a tiempo 0), en un pocillo donde se colocaron la bacteria, medio de cultivo y EPV.

AbsControl0: Absorbancia medida a 630 nm en condiciones iniciales de cultivo a 37 °C (a tiempo 0), en un pocillo donde se colocaron la bacteria y el medio de cultivo.

A través de la implementación de la ecuación matemática antes expresada, se pudo observar el porcentaje de inhibición que producen las distintas formulaciones en las cepas bacterianas ensayadas.

En algunos casos, es de esperarse un valor positivo, lo cual significará que el EPV testado, posee o presenta cierto grado de capacidad inhibitoria del crecimiento. En caso de que el valor encontrado resulte negativo, es correcto interpretar que el EPV podría estar actuando como un activador, protector o simplemente nutriente para el crecimiento bacteriano.

En los casos donde los porcentajes de inhibición donde se combinan EPV con antibióticos superen matemáticamente la sumatoria de los porcentajes de inhibición encontrados para los EPVs y el antibiótico por separado, sugieren una actividad inhibitoria sinérgica.

1.9. Actividad antifúngica.

Ensayos de actividad antifúngica en medio sólido.

El desarrollo de los ensayos de actividad antifúngica se realizó de la misma manera que la actividad antimicrobiana para bacterias tal como se describe en el inciso 1.8.1, incluyendo una modificación al medio de cultivo por el agregado de glucosa al 2 % y 0,5 µg/mL de azul de metileno, para favorecer el contraste y la visualización de los resultados.

Se realizó el ensayo en agar Müller Hilton adicionado con glucosa para determinar la capacidad inhibitoria en el crecimiento de diversas cepas de levaduras, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *Rhodotorula spp* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se preparó un preinóculo en solución fisiológica a partir de colonias previamente crecidas a 37 °C durante 18–24 h, ajustando la turbidez al 0,5 de la escala McFarland. Los inóculos se sembraron con hisopo sobre placas de agar *Müller Hinton* modificado y posteriormente se inocularon 25 µL con gotas de 5 mm de diámetro en los que se colocaron de soluciones de los diferentes extractos a ensayar. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h y a continuación se registraron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (en mm).

Tabla 5: Composición del medio de cultivo Müller Hinton (MH) glucosado.

Composición del medio de cultivo Müller Hinton Glucosado	
Infusión de carne	300 g
Peptona ácida de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	15.0 g
Agua purificada	1000 ml
Glucosa	5 g
pH FINAL: 7.3 ± 0.1	

Medio Müller Hinton de marca Britannia: utilizado para realizar las pruebas de sensibilidad antifúngica de levaduras.

2. Resultados y discusiones.

2.1. Estimación del contenido proteico en los EPVs (extractos crudos y tratamientos térmicos).

El contenido proteico de los diferentes EPVs fue evaluado mediante la técnica colorimétrica de Bradford. Los resultados se expresan en la Tabla 6. Contenidos proteicos de los EPVs:

Tabla 6: Contenido proteico de los EPVs de esta tesis.

Muestra	Concentración proteica (µg/ml)	Muestra	Concentración proteica (µg/ml)
BnEC	660	GdEC	370
BnTT	343	GdTT	350
QEC	923	ShEC	997
QTT7	843	ShTT	940
MdEC	67	StEC	390
MdTT	13	StTT	68
MoEC	180	MAEC	360
MoTT	160	MATT	240

Se muestran los valores de concentración proteica, expresados en (µg/mL), encontrados por el método de Bradford para los diferentes extractos. BnEC *Brassica napus* Extracto Crudo, BnTT *Brassica napus* Tratamiento Térmico a 90 °C, QEC *Chenopodium quinoa* Extracto Crudo, QTT *Chenopodium quinoa* Tratamiento Térmico a 90 °C, MdEC *Morinda citrifolia* Extracto Crudo, MdTT *Morinda citrifolia* Extracto Tratamiento Térmico a 90 °C, MoEC *Moringa oleífera* Extracto Crudo, MoTT *Moringa oleífera* Extracto Tratamiento Térmico a 90 °C, GdEC *Geoffroea decorticans* Extracto Crudo, GdTT *Geoffroea decorticans* Tratamiento Térmico a 90 °C, ShEC *Salvia hispanica* Extracto Crudo, ShTT *Salvia hispanica* Tratamiento Térmico a 90 °C, StEC *Solanum tuberosum* Extracto Crudo, StTT *Solanum tuberosum* Tratamiento Térmico a 90 °C, MAEC *Capsicum annuum* Extracto Crudo, MATT *Capsicum annuum* Tratamiento Térmico a 100 °C.

Como es de esperarse, se puede observar que la mayoría de los EPVs, al ser sometidos al tratamiento térmico, disminuyen su concentración proteica. Es así que los EPVs de chí, chañar, moringa y quinoa son las muestras que poseen mayor porcentaje de proteínas termoestables, respectivamente.

2.2. Perfil electroforético de los EPVs.

Los resultados de los perfiles electroforéticos se muestran a continuación en las figuras 10 - 17. En todos los casos se observa cada corrida utilizando dos tinciones: Tinción de *Coomassie brilliant blue* y tinción de plata.

2.2.1. *Brassica napus*.

En las electroforesis de las muestras de BnEC y de BnTT (Fig. 10), se observa también que se conservan también la mayoría de las bandas, pero muchas de ellas pierden su intensidad, por lo que se esperaría que prolongando el tratamiento térmico dichas bandas tenderían a ir desapareciendo. Esto concuerda con los datos obtenidos por la cuantificación proteica donde la concentración de proteínas para el BnEC fue de 660 $\mu\text{g/mL}$ y para el BnTT fue de 343 $\mu\text{g/mL}$. Por lo tanto, no todas las proteínas presentes en dichas muestras permanecen estables al tratamiento térmico.

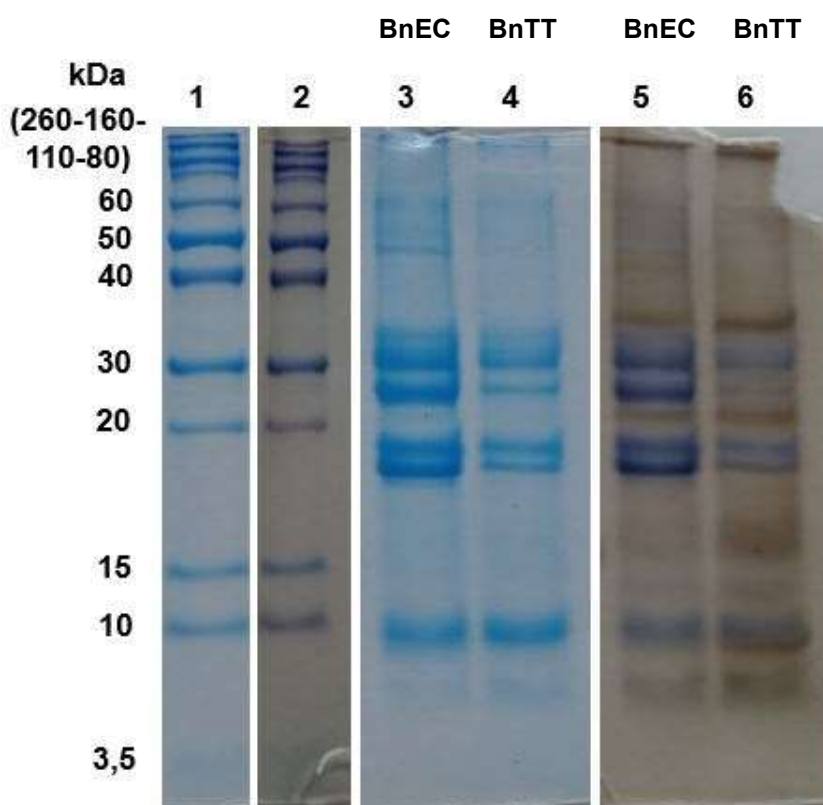


Figura 10: Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de *Brassica napus* Calle 1 y Calle 2: Patrón de peso molecular (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard), con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 3 y calle 5: BnEC, con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 4 y Calle 6: BnTT, con tinción de coomasie blue y tinción de plata.

2.2.2. *Chenopodium quinoa*.

El extracto de quinoa QEC no parece tener un gran contenido proteico (Fig. 11.), y las bandas que se logran resolver en la electroforesis de ambos extractos, QEC y QTT, no parecen muy diferentes, por lo que el tratamiento térmico de 90 °C durante 30 min, no parece ser muy efectivo para generar purificaciones parciales.

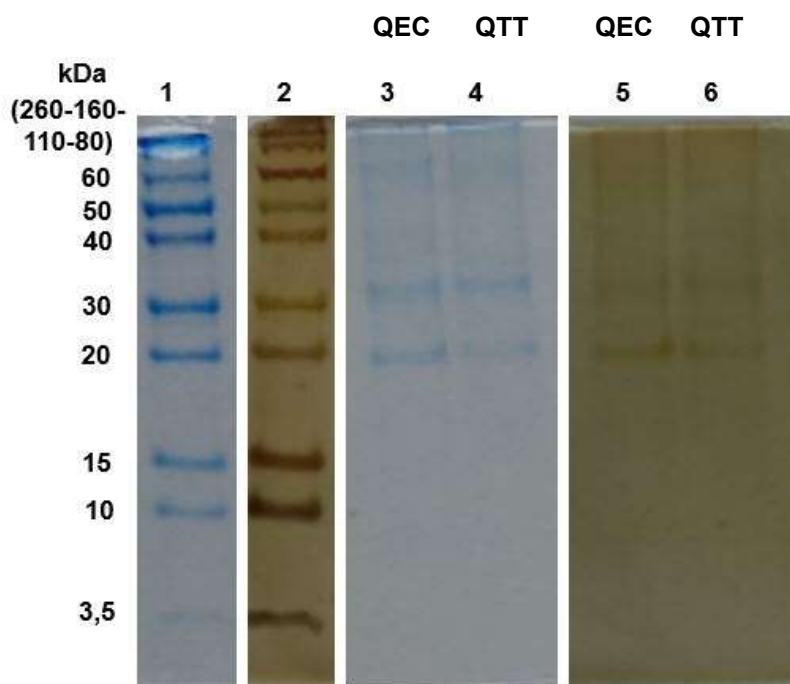


Figura 11: Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de. *Chenopodium quinoa* Calle 1 y Calle 2: Patrón de peso molecular (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard), con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 3 y calle 5: QEC, con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 4 y Calle 6: QTT, con tinción de coomasie blue y tinción de plata.

2.2.3. *Morinda citrifolia*.

Los extractos de morinda no muestran tener una carga proteica muy importante (Fig. 12). Ambas tinciones no alcanzaron a visualizar el perfil proteico por lo que no se puede sacar conclusiones sobre si el tratamiento térmico produce una perdida significativa entre ambos extractos, MdEC y MdTT. Los datos obtenidos por la cuantificación proteica habían arrojado una concentración de proteínas de 67 $\mu\text{g/mL}$ para el MdEC y de 13 $\mu\text{g/mL}$ para el MdTT. Para los próximos ensayos debería concentrarse la muestra a valores mejor cuantificables.

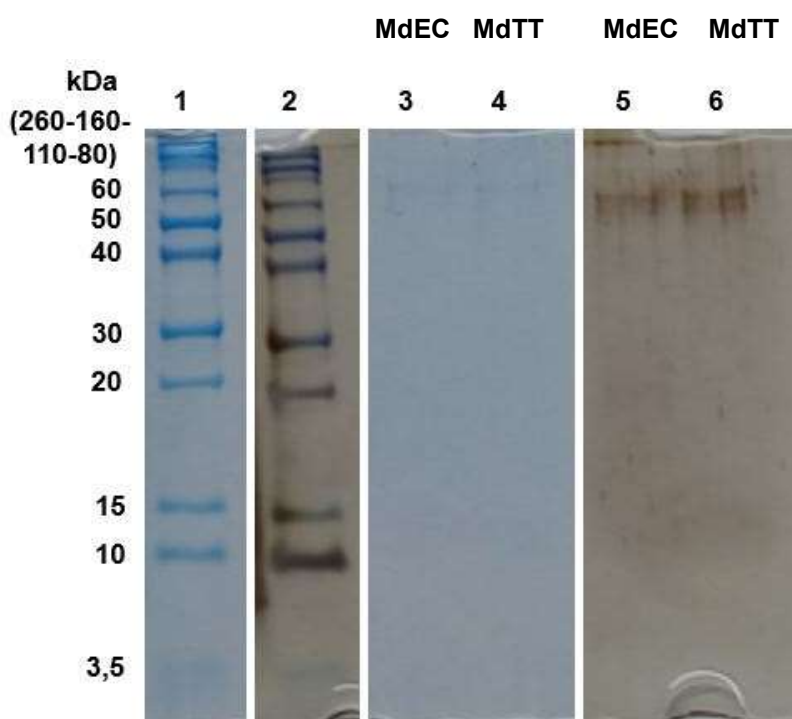


Figura 12: Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de. *Morinda citrifolia* Calle 1 y Calle 2: Patrón de peso molecular (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard), con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 3 y calle 5: MdEC, con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 4 y Calle 6: MdTT, con tinción de coomasie blue y tinción de plata.

2.2.4. *Moringa oleifera*.

En la electroforesis del extracto MoEC se pueden visualizar una serie de bandas que van desde pesos moleculares bajos (~ 10 KDa) hasta valores de aproximadamente 100 KDa. Es interesante comparar el espectro de bandas de ambos extractos y observar que no hay demasiada pérdida por calentamiento a altas temperaturas (Fig. 13). Por lo que el tratamiento térmico en este tipo de muestras no generaría importantes cambios en cuanto a su composición proteica, lo que indicaría que los extractos de semilla de *Moringa oleifera* estarían conformados por proteínas muy estables.

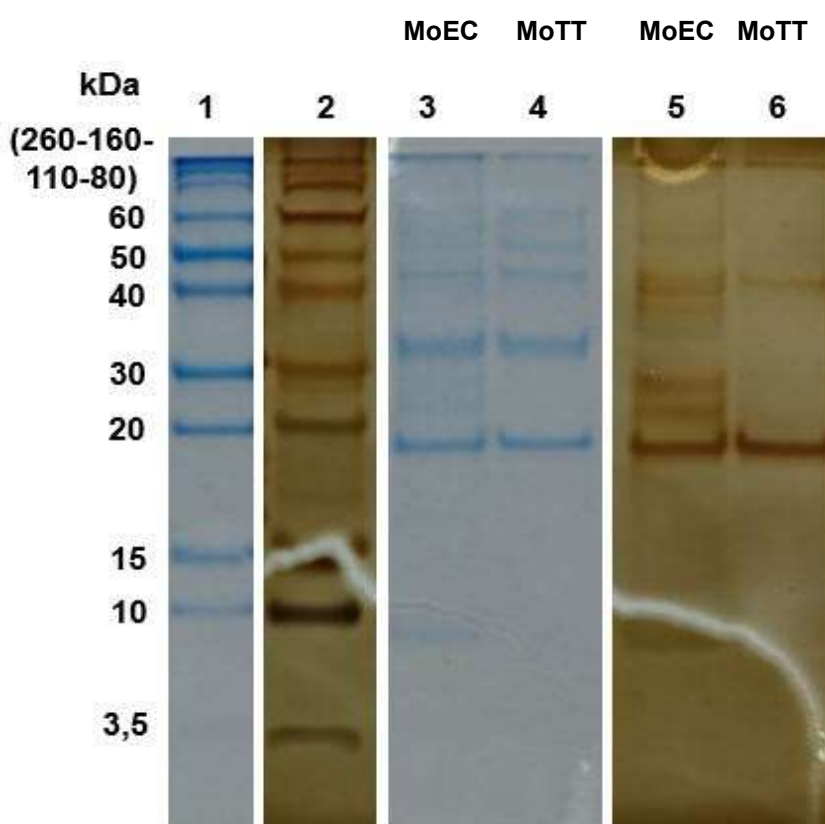


Figura 13: Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de *Moringa oleifera*. Calle 1 y Calle 2: Patrón de peso molecular (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard), con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 3 y calle 5: MoEC, con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 4 y Calle 6: MoTT, con tinción de coomasie blue y tinción de plata.

2.2.5. *Geoffroea decorticans*.

El extracto crudo de Chañar, GdEC, y su tratamiento térmico GdTT, presentan un patrón de bandas con algunas similitudes, salvo algunas bandas de alrededor 30 KDa (Fig. 14), que se hacen más tenues con el tratamiento térmico, sin embargo, en la cuantificación proteica no aparecen diferencias de concentración. Se puede observar, además, en el tratamiento térmico la aparición de bandas pequeñas. Al parecer, durante el tratamiento térmico se concentran proteínas pequeñas muy termoestables, compensando el contenido proteico obtenido (GdEC, 370 µg/mL y GdTT, 350 µg/mL).

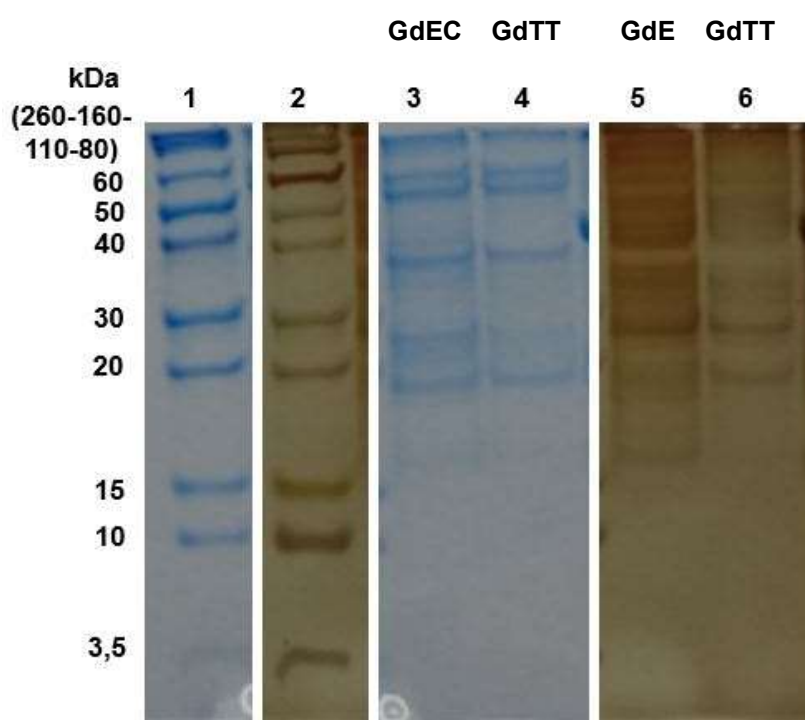


Figura 14: Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de *Geoffroea decorticans* Calle 1 y Calle 2: Patrón de peso molecular (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard), con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 3 y calle 5: MAEC, con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 4 y Calle 6: MATT, con tinción de coomasie blue y tinción de plata.

2.2.6. *Salvia hispanica*.

Las muestras de chía muestran una gran variedad de bandas, ambos extractos conservan la mayor parte de las proteínas, por lo que las semillas de chía poseen una gran proporción de proteínas termoestables (Fig. 15). Esto concuerda con los datos obtenidos por la cuantificación proteica donde la concentración de proteínas para el StEC fue de 997 $\mu\text{g/mL}$ y para el StTT fue de 940 $\mu\text{g/mL}$.

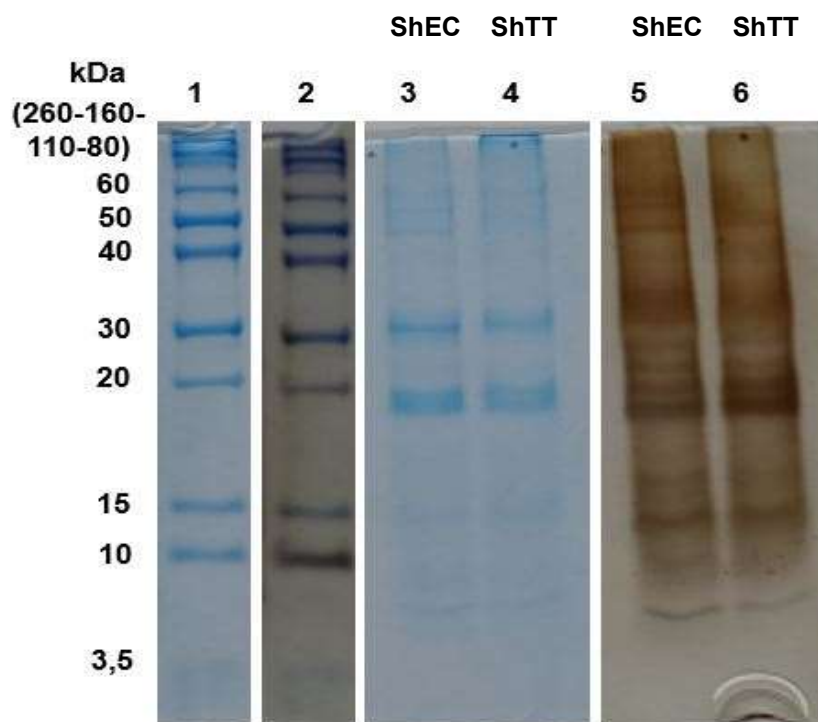


Figura 15: Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de *Salvia hispanica* Calle 1 y Calle 2: Patrón de peso molecular (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard), con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 3 y calle 5: ShEC, con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 4 y Calle 6: ShTT, con tinción de coomasie blue y tinción de plata.

2.2.7. *Solanum tuberosum*.

En el caso de los extractos de papa, podemos observar en el perfil de la corrida electroforética del StEC tres bandas proteicas muy marcadas que luego en la corrida electroforética del extracto StTT desaparecen de manera significativa o quedan muy tenuemente marcadas (Fig. 16). Esto concuerda con los datos obtenidos por la cuantificación proteica donde la concentración de proteínas para el StEC fue de 390 $\mu\text{g/mL}$ y para el StTT fue de 68 $\mu\text{g/mL}$. Se aprecia así y de manera general en todo el perfil de corrida, que el extracto de papa posee mayor cantidad de proteínas termolábiles.

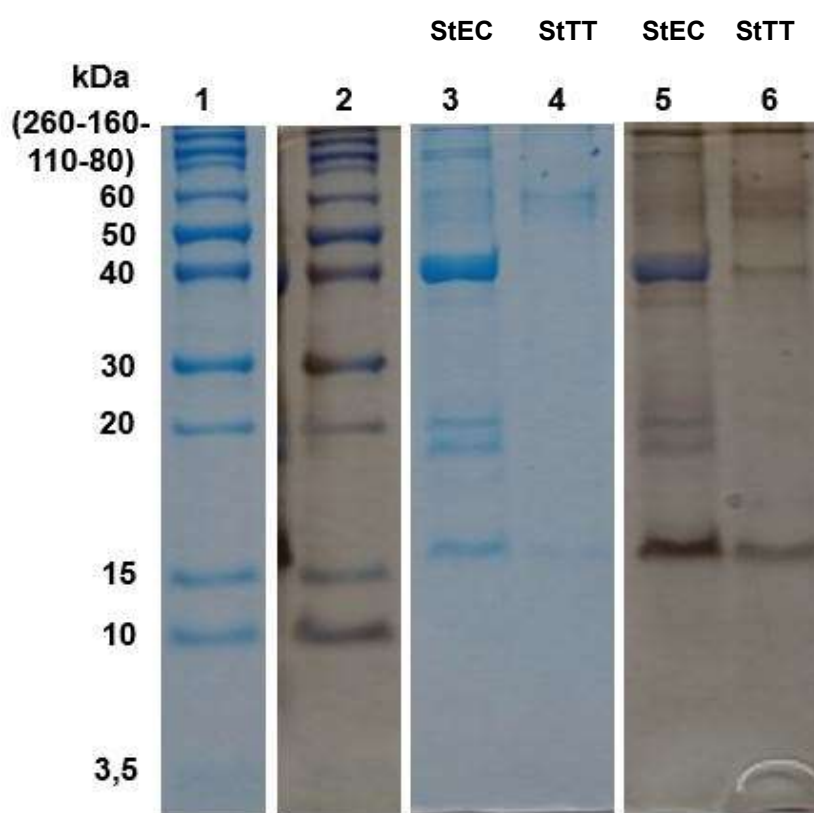


Figura 16: Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de *Solanum tuberosum* Calle 1 y Calle 2: Patrón de peso molecular (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard), con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 3 y calle 5: StEC, con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 4 y Calle 6: StTT, con tinción de coomasie blue y tinción de plata.

2.2.8. *Capsicum annuum*.

En el caso del morrón amarillo (Fig. 17), podemos ver que nuevamente, que el perfil de bandas electroforéticas se conserva entre ambos extractos, aunque se observa que algunas bandas principales (alrededor de 40-50 KDa) se han perdido por el tratamiento térmico y otras han disminuido su intensidad. Esto concuerda con los datos obtenidos por la cuantificación proteica donde la concentración de proteínas para el MAEC fue de 360 µg/mL y para el MATT fue de 240 µg/mL. Por lo que en el caso de MAEC y MATT, aunque la mayoría de las proteínas de sus semillas son termoestables, podemos constatar que algunas son termolábiles.

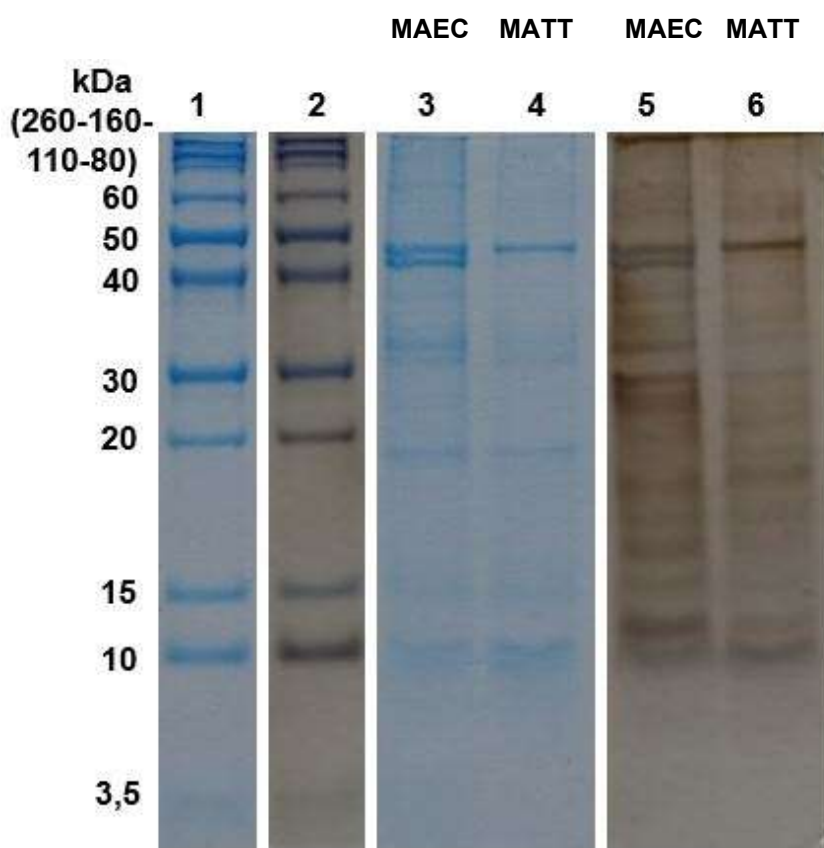


Figura 17: Electroforesis SDS-PAGE de los extractos de *Capsicum annuum* Calle 1 y Calle 2: Patrón de peso molecular (Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard), con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 3 y calle 5: MAEC, con tinción de coomasie blue y tinción de plata. Calle 4 y Calle 6: MATT, con tinción de coomasie blue y tinción de plata.

Al analizar estos resultados en conjunto (concentración proteica y perfil electroforético), es llamativo que la mayoría de los EPVs estudiados, están conformados por proteínas muy termoestables. Es así que, el tratamiento térmico no genera una gran pérdida de proteínas,

situación generalmente no habitual en muestras vegetales, ya que en un tratamiento térmico se suele eliminar gran parte de las proteínas, y solo quedan las más estables; como en el caso de la papa donde el extracto StEC contiene 390 µg/mL y en el caso del extracto con tratamiento térmico StTT conserva solo 68 µg/mL. Esta situación nos permite hipotetizar que, debido a su función, y los posibles ciclos ambientales a los que pueden ser sometidas las semillas, las proteínas que las constituyen, hayan evolucionado para ser mucho más termoestables que la de otros tejidos vegetales, como en el caso de la papa, cuyos extractos se realizan a partir del tubérculo.

2.3. Detección de actividad inhibitoria de proteasas.

- Actividad inhibitoria de Tripsina.

Se realizarán ensayos de búsqueda de actividad inhibitoria de la proteasa tripsina en los diferentes EPVs. En estos ensayos de inhibición de tripsina, se usó tripsina como proteasa y BApNA (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) como sustrato, el cual libera p-nitrofenol (color amarillo, 405nm) cuando es hidrolizado.

- Actividad inhibitoria de Papaina.

Se realizarán ensayos de búsqueda de actividad inhibitoria de la proteasa Papaína en los diferentes EPVs. En estos ensayos se usó papaína como proteasa y PFLNA (L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-p-nitroanilida) como sustrato. El producto de la hidrolisis de PFLNA es p-nitroanilida, de color amarillo, es seguido cinéticamente por un aumento en la lectura de la absorbancia (410 nm) en función del tiempo. El buffer utilizado fue fosfatos 0,1 M, KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM, Cys 3 mM, pH 6,5.

Una pendiente positiva en estos ensayos indica que la enzima funciona correctamente y nos sirve como control positivo de la reacción.

2.3.1. Actividad inhibitoria de los extractos de canola.

En las Figs. 18, se grafica la actividad inhibitoria de Tripsina y Papaína respectivamente, para los extractos de BnEC y BnTT.

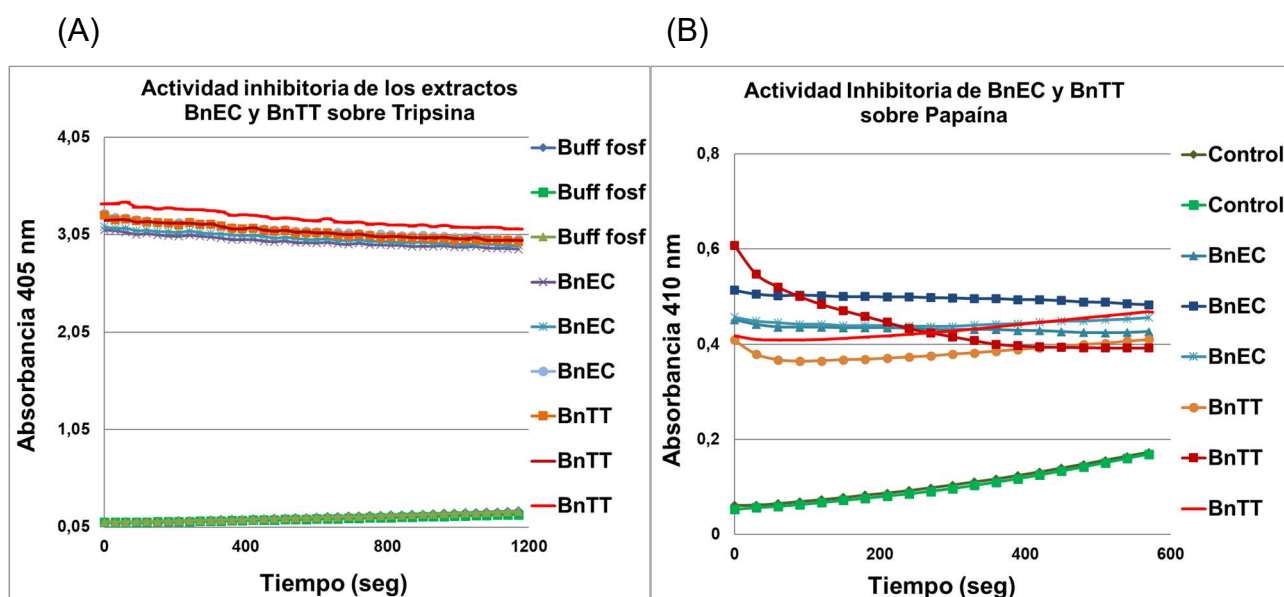


Figura 18 A: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la tripsina a través de la degradación del sustrato sintético BApNA. (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de BnEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Canola. Las curvas de BnTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto Canola con tratamiento térmico a 90 °C.

Figura 18 B: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la papaína a través de la producción de p-nitroanilida medible a 410 nm a partir de PFLNA. Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de BnEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Canola. Las curvas de BnTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto de Canola con tratamiento térmico a 90 °C.

En la Fig. 18 A, los extractos BnEC y BnTT de canola presentaron una absorbancia por encima del rango de detección, por lo tanto, no pueden apreciarse las diferencias de pendientes entre el control y las muestras. Esto puede deberse a la pigmentación o coloración de cada extracto, la cual persiste incluso durante el tratamiento térmico. El ensayo puede repetirse empleando diluciones del BnEC y BnTT.

Se observa, en la Fig. 18B, que, al enfrentar la enzima frente a los extractos de canola, pierde actividad proteolítica. De esta manera, en presencia de los extractos de BnEC, la lectura de absorbancia queda estancada en el valor inicial (0,4-0,5 Abs.) a través del tiempo. Se observa que, tanto en el BnEC como en el BnTT, no hay hidrólisis, por lo que se no produce el cambio de color y esto marca que el extracto de canola SI tiene actividad inhibitoria de la enzima papaína. El valor de absorbancia elevado puede deberse a la pigmentación fuerte que presentan estos extractos.

2.3.2. Actividad inhibitoria de los extractos de quinoa.

En la Figura 19, se grafica la actividad inhibitoria de Tripsina y Papaína respectivamente, para los extractos de QEC y QTT.

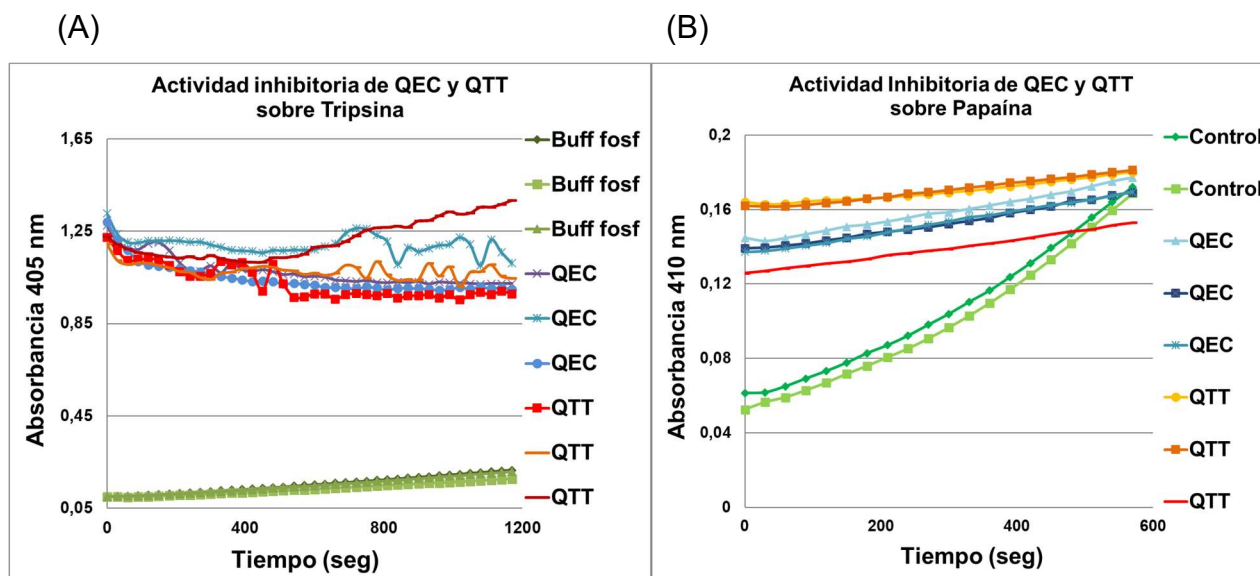


Figura 19 A: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la tripsina a través de la degradación del sustrato sintético BApNA. (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de QEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Quinoa. Las curvas de QTT90 corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto con tratamiento térmico a 90°C.

Figura 19 B: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la papaína a través de la producción de p-nitroanilida medible a 410nm a partir de PFLNA. Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de QEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Quinoa. Las curvas de QTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto de Quinoa con tratamiento térmico a 90°C.

En la Figura 19 A., se observa que, los extractos QEC y QTT de quinoa presentaron una absorbancia por encima del rango de detección, por lo tanto, no pueden apreciarse las diferencias de pendientes entre el control y las muestras. En principio ambas muestras presentarían actividad inhibitoria de tripsina, pero para confirmarlo el ensayo debe repetirse empleando diluciones del QEC y QTT.

En la Figura 19 B., se observa que, al enfrentar la enzima frente a los extractos de quinoa, la proteasa papaína pierde levemente su actividad y la lectura de absorbancia sube con una menor pendiente que el control positivo. Se observa que, tanto en el QEC como en el QTT, la hidrólisis es suave, por lo que se produce un paulatino cambio de color y esto marca que el extracto de canola SI tiene actividad inhibitoria de la enzima papaína. El valor de absorbancia elevado puede deberse a la pigmentación fuerte que presentan estos extractos.

2.3.3. Actividad inhibitoria de los extractos de morinda.

En la figura 20 se grafica la actividad inhibitoria de Tripsina y Papaína respectivamente, para los extractos de MdEC y el MdTT.

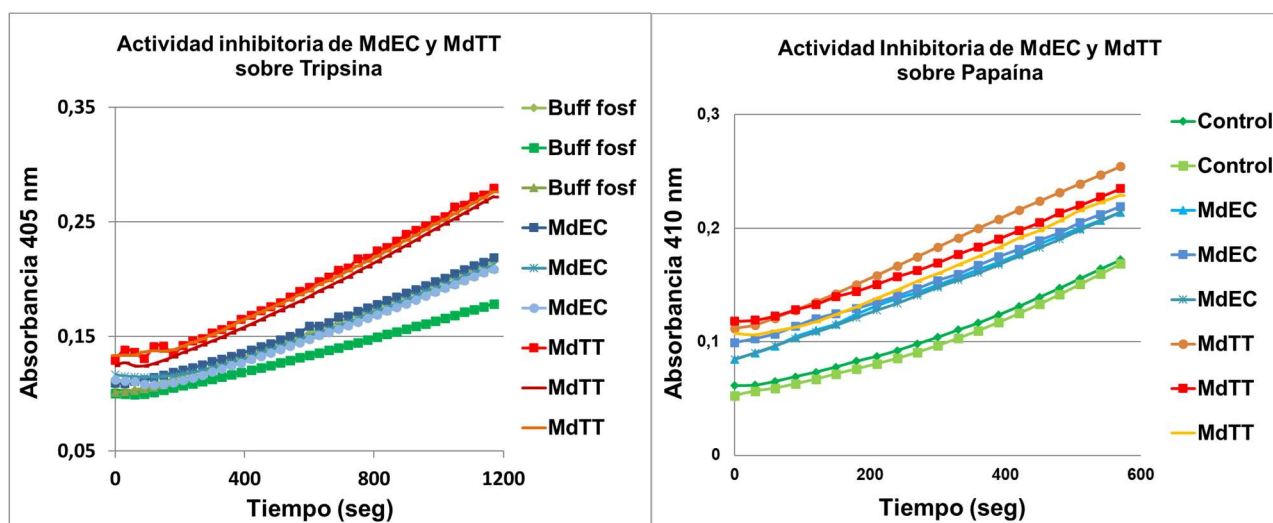


Figura 20 A: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la tripsina a través de la degradación del sustrato sintético BAPNA. (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de MdEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Morinda. Las curvas de MdTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto Morinda con tratamiento térmico a 90°C.

Figura 20 B: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la papaína a través de la producción de p-nitroanilida medible a 410nm a partir de PFLNA Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de MdEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Morinda. Las curvas de MdTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto de Morinda con tratamiento térmico a 90°C.

En la figura 20 A., se observa que bajo las condiciones ensayadas no se observa actividad inhibitoria de tripsina para el MdEC y el MdTT, ya que, en este caso, al estar presente el extracto hay hidrólisis, por lo que se produce el cambio de color y esto marca que el extracto de morinda no tiene actividad inhibitoria de la enzima.

En la Figura 20 B., se observa que al enfrentar la enzima papaína frente a los extractos de morinda, tanto en el MdEC como en el MdTT extracto, hay hidrólisis, por lo que se produce el cambio de color y esto indica que con las concentraciones obtenidas en el extracto de morinda NO se observa actividad inhibitoria de la enzima.

2.3.4. Actividad inhibitoria de los extractos de moringa.

En la figura 21 se grafica la actividad inhibitoria de Tripsina y Papaína respectivamente, para los extractos de MoEC y el MoTT.

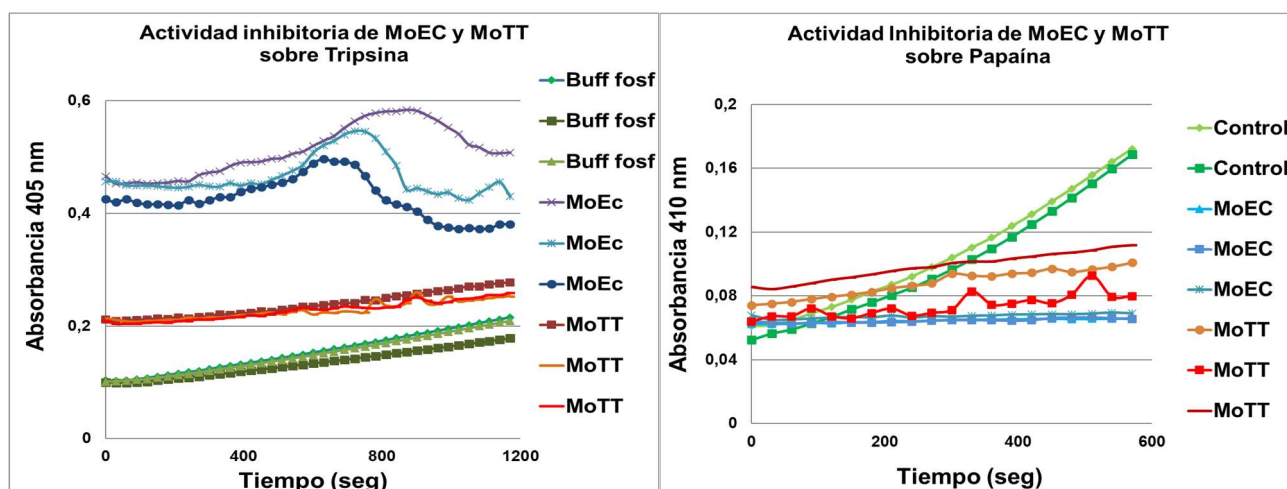


Figura 21 A: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la tripsina a través de la degradación del sustrato sintético BApNA. (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de MoEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Moringa. Las curvas de MoTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto de Moringa con tratamiento térmico a 90°C.

Figura 21 B: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la papaína a través de la producción de p-nitroanilida medible a 410nm a partir de PFLNA. Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de MoEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Moringa. Las curvas de MoTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto de Moringa con tratamiento térmico a 90°C.

En la Figura 21 A., tanto en el caso de MoEC como así de MoTT se evidencia un incremento en la actividad de tripsina, por lo que no se evidencia la presencia de un inhibidor de tripsina.

En la Figura 21 B. se observa que, al enfrentar la enzima frente a los extractos de semillas de moringa, la proteasa papaína pierde actividad y la lectura de absorbancia queda estancada en el valor inicial (0,06 Abs) a través del tiempo. Se observa que, tanto en el MoEC como en el MoTT, no hay hidrólisis, por lo que se no produce el cambio de color y esto marca que el extracto de moringa SI tiene actividad inhibitoria de la enzima papaína.

2.3.5. Actividad inhibitoria de los extractos de chañar.

En la Figura 22 se grafica la actividad inhibitoria de Tripsina y Papaína respectivamente, para los extractos GdEC y el GdTT.

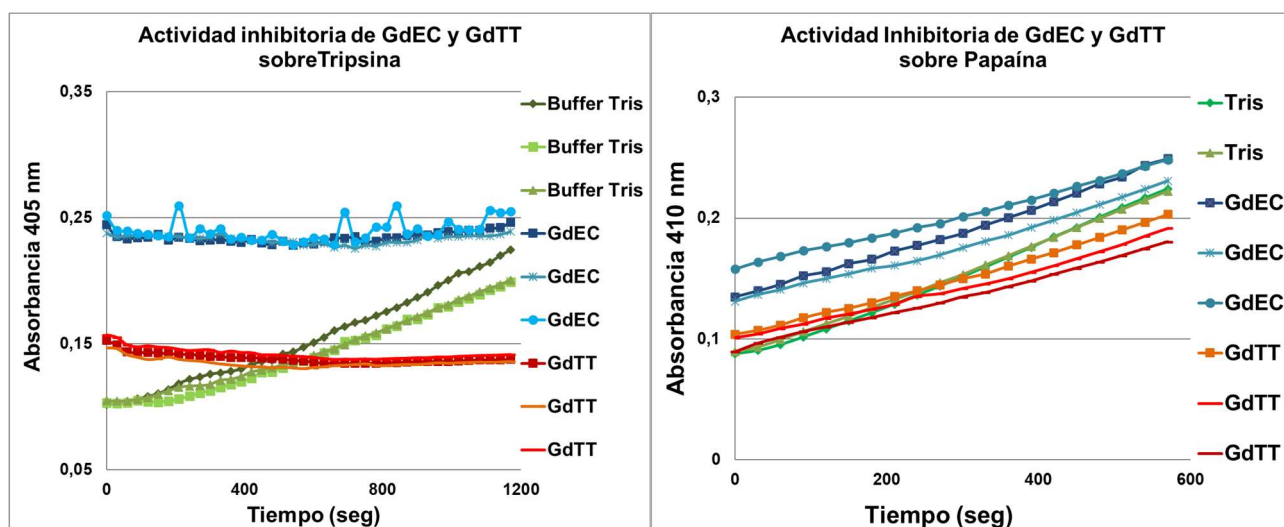


Figura 22 A: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la tripsina a través de la degradación del sustrato sintético BApNA. (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de GdEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Chañar. Las curvas de GdTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto Chañar con tratamiento térmico a 90°C.

Figura 22 B. Se realizaron las determinaciones de la actividad de la papaína a través de la producción de p-nitroanilida medible a 410nm a partir de PFLNA Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de Gd corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Mo-*ringa. Las curvas de GdTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto de Moringa con tratamiento térmico a 90°C.

En la Figura 22 A., la curva muestra que en las reacciones donde se ha usado como control el buffer Tris-HCl, las curvas presentan una recta significativa, donde claramente va aumentando la pendiente, ya que hay enzima y su sustrato hidrolizándose. Al incubarlo con los extractos de chañar, se puede verificar que no hay hidrólisis, por lo que no se produce el cambio de color, indicando que el extracto de chañar tiene actividad inhibitoria de la enzima.

Las diferencias observadas en las absorbancias iniciales, respecto a las reacciones que contienen los extractos, se debe probablemente a la presencia de polifenoles (absorben a 330nm) o compuestos de color en dichas muestras, que a través de sus colas espectrales pueden absorber a 405 nm. También se observa que en el tratamiento térmico se pierde un porcentaje del color inicial de los mismos, bajando la absorbancia, dando a entender que estos compuestos de color se hidrolizarían o degradarían frente a un tratamiento a altas temperaturas.

En la Figura 22 B. se observa que, al enfrentar la enzima frente a los extractos de chañar, en similares condiciones al control positivo, pero con extracto, la proteasa papaína debería perder actividad y la lectura de absorbancia no debería presentar pendiente positiva.

Sin embargo, observamos que, tanto en el GdEC como en el GdTT extracto, hay hidrólisis, por lo que se produce el cambio de color y esto marca que el extracto de chañar NO tiene actividad inhibitoria de la enzima.

2.3.6 Actividad inhibitoria de los extractos de chía.

En la Figuras 23 se grafica la actividad inhibitoria de Tripsina y Papaína respectivamente, para los extractos de ShEC y ShTT.

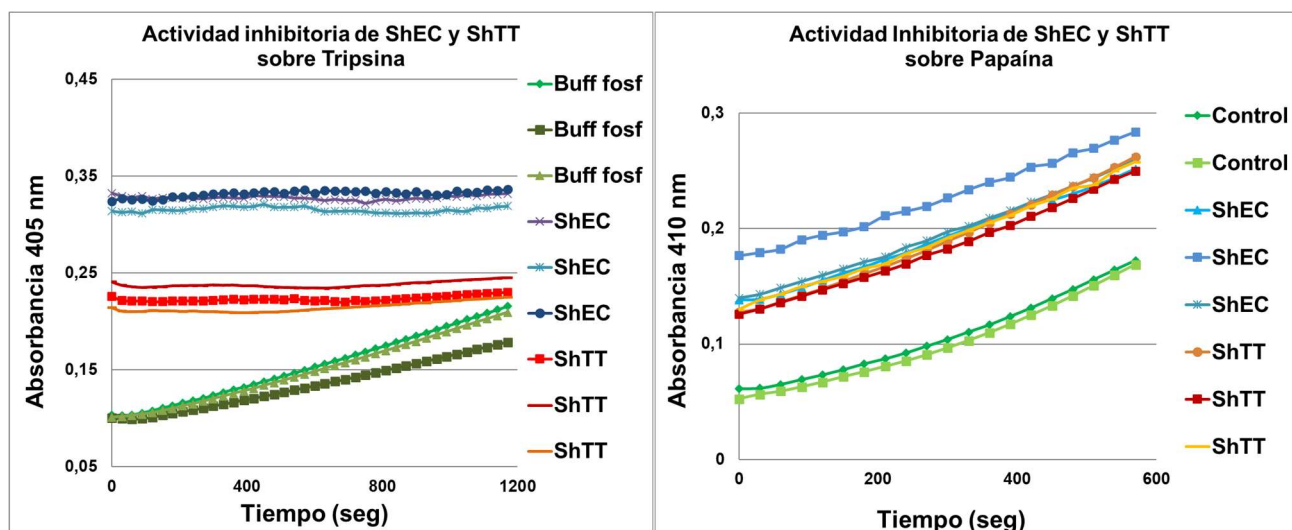


Figura 23 A: se realizaron las determinaciones de la actividad de la tripsina a través de la degradación del sustrato sintético BApNA. (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de ShEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Chía. Las curvas de ShTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto Chía con tratamiento térmico a 90°C.

Figura 23 B: se realizaron las determinaciones de la actividad de la papaína a través de la producción de p-nitroanilida medible a 410nm a partir de PFLNA Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de ShEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Moringa. Las curvas de ShTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto de Moringa con tratamiento térmico a 90°C.

De acuerdo a los resultados observados en la Figura 23 A., se observa actividad inhibitoria de tripsina en el ShEC y en el ShTT de chía ya que no hay aumento de la absorbancia cuando se sigue la cinética de inhibición. En cambio, en ausencia de ShEC o de ShTT, la curva tiene una pendiente positiva esperable de la hidrolisis del sustrato por parte de la proteasa.

En la Figura 23B., se observa que al enfrentar la enzima Papaína frente a los extractos de chía, tanto en el ShEC como en el ShTT extracto, hay hidrólisis, por lo que se produce el cambio de color y esto marca que el extracto de chía NO tiene actividad inhibitoria de la enzima.

2.3.7. Actividad inhibitoria de los extractos de papa.

En la figura 24 se grafica la actividad inhibitoria de Tripsina y Papaína respectivamente, para los extractos de StEC y el StTT.

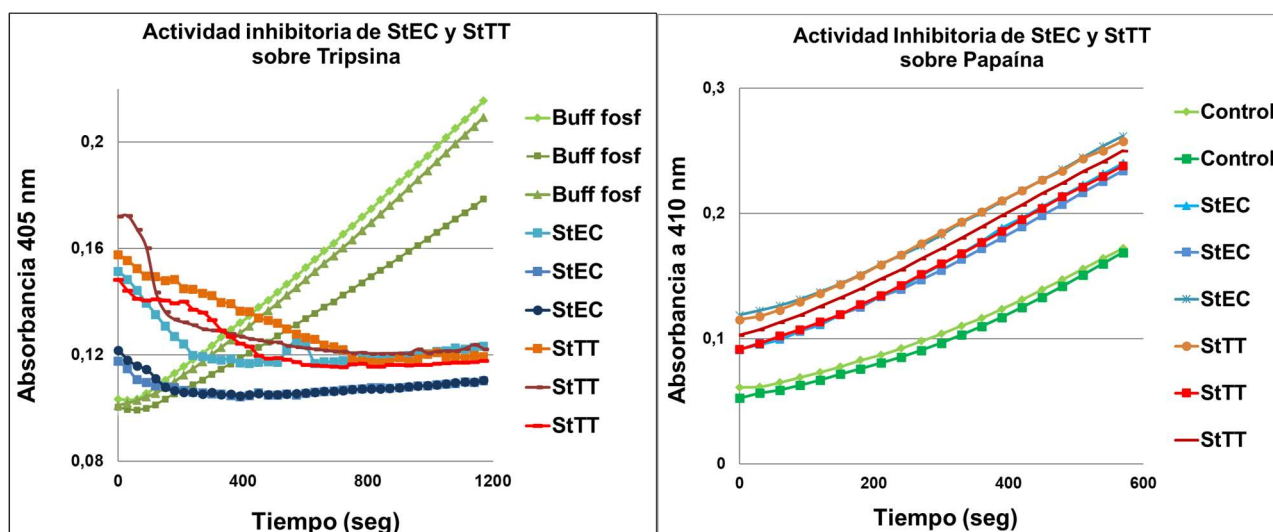


Figura 24 A: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la tripsina a través de la degradación del sustrato sintético BApNA. (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de StEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Papa. Las curvas de StTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto de Papa con tratamiento térmico a 90°C.

Figura 24 B: Se realizaron las determinaciones de la actividad inhibitoria de la papaína a través de la producción de p-nitroanilida medible a 410nm a partir de PFLNA Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de StEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Papa. Las curvas de StTT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto de Papa con tratamiento térmico a 90°C.

En la figura 24A. se observa que el StEC y el StTT de los extractos de papa, poseen actividad inhibitoria de tripsina, tal como se espera que en estas muestras de acuerdo a estudios anteriores (Revina et al., 2010).

En la Figura 24 B. se observa que al enfrentar la enzima papaína frente a los extractos de papa, tanto en el StEC como en el StTT extracto, hay hidrólisis, por lo que se produce el cambio de color y esto indica que con las concentraciones obtenidas en el extracto de papa NO se observa actividad inhibitoria de la enzima.

2.3.8. Actividad inhibitoria de los extractos de morrón amarillo.

En la Figura 25 se grafica la actividad inhibitoria de Tripsina y Papaína respectivamente, para los extractos de MAEC y el MATT.

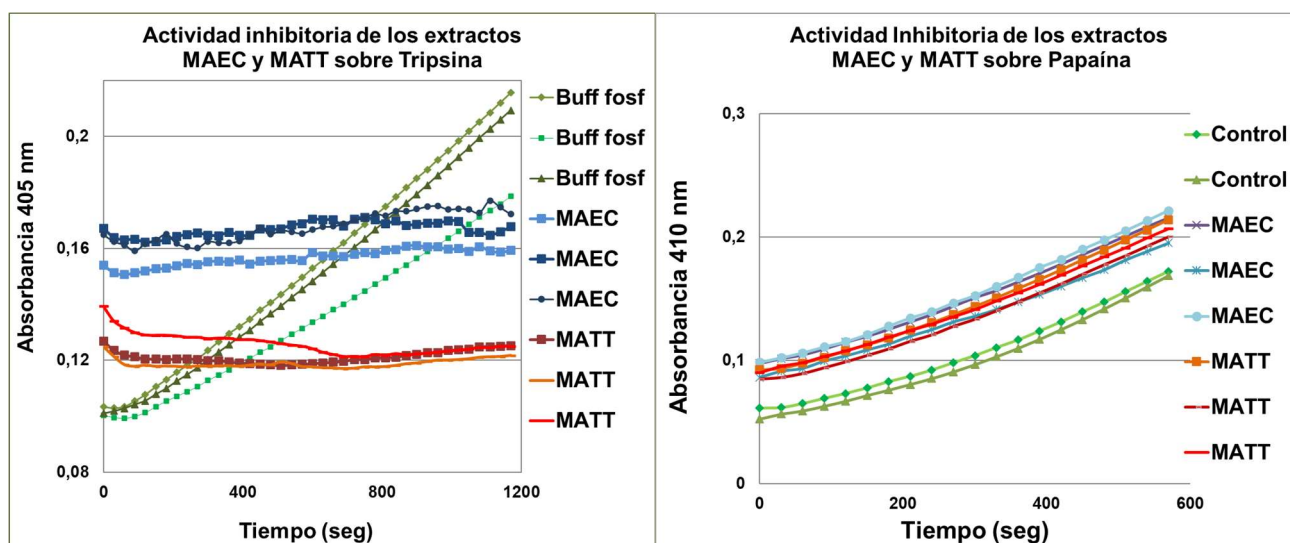


Figura 25A: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la tripsina a través de la degradación del sustrato sintético BApNA. (N- α -Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida). Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de MAEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Morrón amarillo. Las curvas de MATT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto Morrón amarillo con tratamiento térmico a 90°C

Figura 25B: Se realizaron las determinaciones de la actividad de la papaína a través de la producción de p-nitroanilida medible a 410nm a partir de PFLNA. Cada determinación se realizó por triplicado. Las curvas de MAEC corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto crudo de Morrón amarillo. Las curvas de MATT corresponden a las mezclas donde se incorporó el extracto Morrón amarillo con tratamiento térmico a 90°.

En la Figura 25A., se observa que ambos extractos de morrón amarillo, MAEC y MATT, poseen actividad inhibitoria de tripsina. Lo que queda evidenciado porque al graficar la absorbancia a 410nm vemos que no hay degradación del sustrato a lo largo del tiempo, y que por lo tanto hay una inhibición de la Tripsina.

En la Figura 25B., se observa que al enfrentar la enzima papaína frente a los extractos de morrón amarillo, tanto en el MAEC como en el MATT extracto, hay hidrólisis, por lo que se produce el cambio de color y esto indica que con las concentraciones obtenidas en el extracto de morrón NO se observa actividad inhibitoria de la Papaína.

De acuerdo a los cálculos de los porcentajes de actividad inhibitoria de Tripsina obtenidos, las muestras que tienen actividad inhibitoria de Tripsina son: GdEC (100%), GdTT (100%), ShEC (100%), ShTT (100%), MoEC (100%), MoTT (60%), MAEC (100%), MATT (100%), StEC (90%), StTT (90%). Con estos valores se vislumbra que las muestras de *Geoffroea decorticans*, *Salvia hispanica*, *Moringa oleifera*, *Capsicum annuum* y *Solanum tuberosum* serían las cinco fuentes más interesantes para estudiar y extraer inhibidores.

De acuerdo a los cálculos de los porcentajes de actividad inhibitoria de papaína obtenidos, las muestras que tienen actividad inhibitoria de papaína son: MoEC (100%), MoTT (80%), BnEC (100%), BnTT (60%), QEC (70%), QTT (80%), GdEC (30%) y GdTT (35%). Con estos valores se vislumbra que las muestras de *Moringa oleífera* y *Brassica napus* y *Chenopodium quinoa* serían las tres fuentes más interesantes para estudiar y extraer inhibidores.

2.4. Evaluación preliminar de actividad antioxidante de los EPVs

Actividad antioxidante por ABTS

Para realizar este primer ensayo preliminar se usaron todos los EPVs en las siguientes concentraciones, expresadas ($\mu\text{g/mL}$): GdEC, 535; GdTT, 245; ShEC, 557; ShTT, 360; MoEC, 218; MoTT, 209; MAEC, 315; MATT, 170; StEC, 14; StTT, 13; MdEC, 35; MdTT, 32; BnEC, 673; BnTT, 282; QEC, 519; QTT, 454. Se realizó luego la técnica de acuerdo al protocolo descrito en la Sec. 1.2. del Cap. 2. De este modo fue posible observar que las muestras de MdEC, MdTT, MAEC y MATT presentaron entre un 40-60 % de actividad antioxidante, mientras que las muestras de QEC, QTT, MoEC, MoTT, ShEC, ShTT, StEC y StTT presentaron entre 70-80 % de actividad antioxidante. Por último, las muestras de BnEC, BnTT, GdEC y GdTT fueron las que presentaron mayor poder antioxidante alcanzando un 95 % de inhibición en las condiciones de ensayo (Fig. 26).

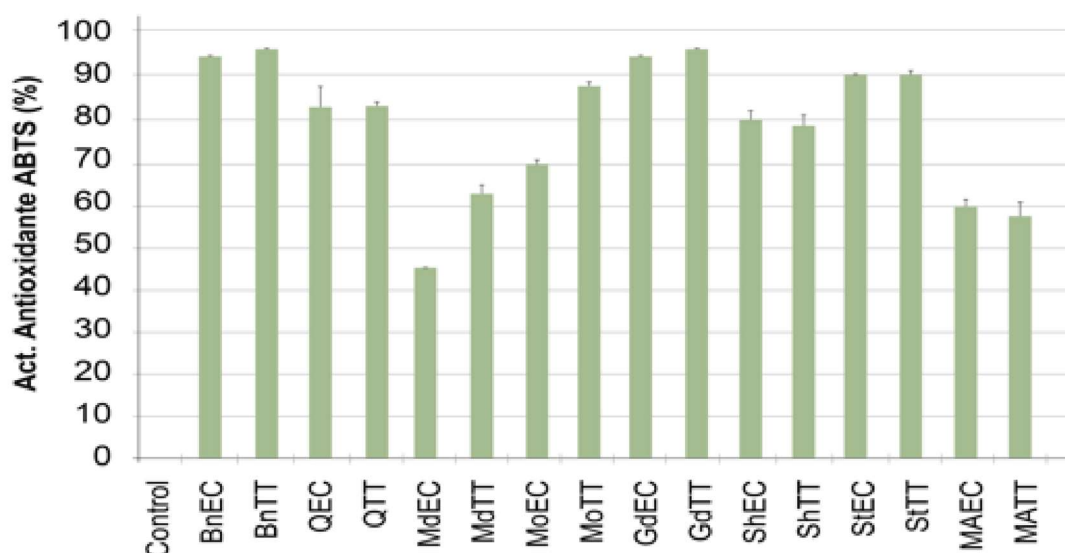


Figura 26: Actividad antioxidante porcentual (mediante la técnica de ABTS) de los diferentes EPVs. BnEC: *Brassica napus* Extracto Crudo, BnTT: *Brassica napus* Tratamiento Térmico; QEC: *Chenopodium quinoa* Extracto Crudo, QTT: *Chenopodium quinoa* Tratamiento Térmico; MdEC: *Morinda citrifolia* Extracto Crudo, MdTT: *Morinda citrifolia* Tratamiento Térmico; MoEC: *Moringa oleífera* Extracto Crudo MoTT: *Moringa oleífera* Tratamiento Térmico; GdEC: *Geoffroea decorticans* Extracto Crudo, GdTT: *Geoffroea decorticans* Tratamiento Térmico; ShEC: *Salvia hispanica* Extracto Crudo, ShTT: *Salvia hispanica* Tratamiento Térmico; StEC: *Solanum tuberosum* Extracto Crudo, StTT: *Solanum tuberosum* Tratamiento Térmico; MAEC: *Capsicum annuum* Extracto Crudo, MATT: *Capsicum annuum* Tratamiento Térmico.

A continuación, y a modo de realizar un estudio preliminar comparativo, se realizó el ensayo de actividad antioxidante con ABTS, pero utilizando una concentración inicial de cada muestra de 200 µg/mL de manera de normalizar el estudio. Los nuevos resultados se observan en la Fig. 27. Allí se ve que BnEC y BnTT mantienen un alto grado de actividad antioxidante. También se visualiza que GdTT posee un 75 % de actividad y que GdEC posee un 50 %. En líneas generales se observa que al normalizar el ensayo son varias las muestras que poseen entre un 25 y un 50 % de actividad antioxidante (ShEC, ShTT, StTT, MAEC, MATT, MoEC, MoTT, QEC y QTT). Es de destacar que los tratamientos térmicos han resultado tener en líneas generales, mayor actividad antioxidante, posiblemente eliminando en gran parte de las muestras componentes que interferían con ello. En general, muchos componentes del metabolismo secundario de las plantas suelen ser inestables o frágiles al tratamiento térmico, entre ellos taninos, terpenos, alcaloides, polifenoles, carotenoides, etc. Entre estos componentes los polifenoles, carotenoides, etc., aportan una importante actividad antioxidante a los extractos vegetales. Por lo que, posiblemente gran parte de la actividad antioxidante sea debido a péptidos termoestables naturales o compuestos naturales no peptídicos termoestables.

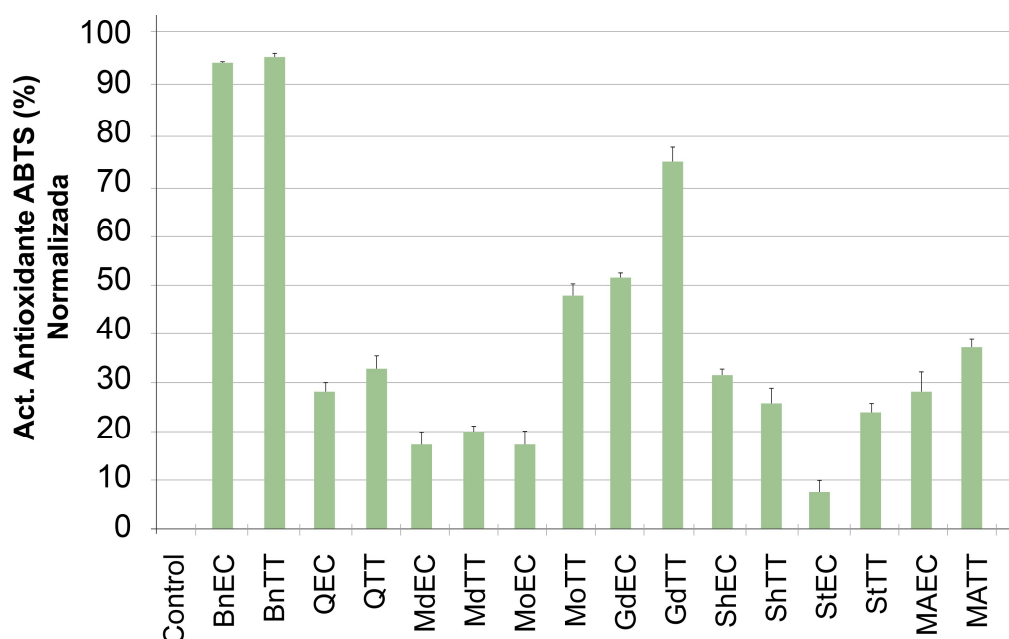


Figura 27: Actividad antioxidante porcentual normalizada (método de ABTS) para los distintos extractos. BnEC: *Brassica napus* Extracto Crudo, BnTT: *Brassica napus* Tratamiento Térmico; QEC: *Chenopodium quinoa* Extracto Crudo, QTT: *Chenopodium quinoa* Tratamiento Térmico; MdEC: *Morinda citrifolia* Extracto Crudo, MdTT: *Morinda citrifolia* Tratamiento Térmico; MoEC: *Moringa oleifera* Extracto Crudo MoTT: *Moringa oleifera* Tratamiento Térmico; GdEC: *Geoffroea decorticans* Extracto Crudo, GdTT: *Geoffroea decorticans* Tratamiento Térmico; ShEC: *Salvia hispánica* Extracto Crudo, ShTT: *Salvia hispánica* Tratamiento Térmico; StEC: *Solanum tuberosum* Extracto Crudo, StTT: *Solanum tuberosum* Tratamiento Térmico; MAEC: *Capsicum annuum* Extracto Crudo, MATT: *Capsicum annuum* Tratamiento Térmico.

De los resultados obtenidos las muestras de canola y chañar resultan interesantes para estudiar sus posibles péptidos con actividad antioxidante.

2.5. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa de los EPVs.

Se realizó un ensayo de búsqueda de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa con posibles efectos hipoglucemiante de los diferentes EPVs. Los resultados obtenidos, medidos como la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de cada EPV, mostraron que las únicas muestras con potencial actividad hipoglucemiantes, a las concentraciones ensayadas (200 μ g/mL), fueron GdEC y GdTT. Los valores de inhibición para cada extracto fueron de 51,5 $\pm$ 2,1 de actividad inhibitoria para GdEC y de 72,6 % $\pm$ 1,8 para GdTT. Las demás muestras no mostraron actividad inhibitoria de α -glucosidasa (Fig. 28).

Resulta interesante haber demostrado la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa de los extractos de chañar, dato que genera expectativa en cuanto a la naturaleza química de la molécula responsable de dicha actividad y respecto a su utilización en el futuro, como fuente natural, para el tratamiento de ciertas afecciones relacionados con desórdenes metabólicos.

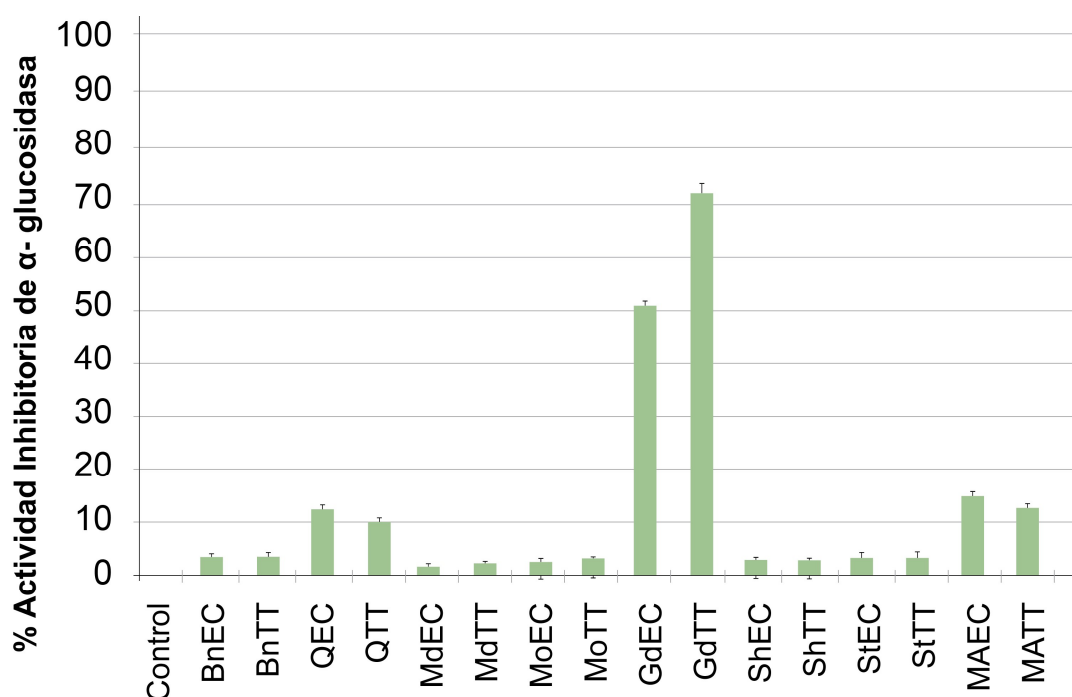


Figura 28: Actividad inhibitoria porcentual de la enzima α -glucosidasa, en los diferentes EPVs, sobre la enzima α glucosidasa. BnEC: *Brassica napus* Extracto Crudo, BnTT: *Brassica napus* Tratamiento Térmico; QEC: *Chenopodium quinoa* Extracto Crudo, QTT: *Chenopodium quinoa* Tratamiento Térmico; MdEC: *Morinda citrifolia* Extracto Crudo, MdTT: *Morinda citrifolia* Tratamiento Térmico; MoEC: *Moringa oleifera* Extracto Crudo MoTT: *Moringa oleifera* Tratamiento Térmico; GdEC: *Geoffroea decorticans* Extracto Crudo, GdTT: *Geoffroea decorticans* Tratamiento Térmico; ShEC: *Salvia hispánica* Extracto Crudo, ShTT: *Salvia hispánica* Tratamiento Térmico; StEC: *Solanum tuberosum* Extracto Crudo, StTT: *Solanum tuberosum* Tratamiento Térmico; MAEC: *Capsicum annuum* Extracto Crudo, MATT: *Capsicum annuum* Tratamiento Térmico.

Se observa que los únicos extractos que muestran actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa significativa son las muestras provenientes de semillas de chañar: GdEC y GdTT.

2.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EPVs

2.6.1. Ensayos de inhibición de los extractos sobre el crecimiento bacteriano en medios sólidos.

Se procedió según la técnica descrita en la Sec. 1.8.1. de este capítulo.

Las concentraciones de EPVs utilizadas fueron las siguientes: GdEC: 742 µg/mL; GdTT: 701 µg/mL; ShEC: 1995 µg/mL, ShTT: 1879 µg/mL; MoEC: 194 µg/mL; MoTT: 329 µg/mL; MAEC: 719 µg/mL; MATT: 481 µg/mL; StEC: 781 µg/mL; StTT: 137 µg/mL; MdEC: 134 µg/mL; MdTT: 25 µg/mL; BnEC: 1362 µg/mL; BnTT: 686 µg/mL; QEC: 1846 µg/mL y QTT: 686 µg/mL.

Para lograr estas concentraciones cada EPV fue liofilizado y resuspendido en un 1/2 del volumen inicial. Luego, para su correcto uso en bacteriología, cada muestra fue filtrada con filtros de esterilización autoclavables y reutilizables.

Los ensayos de actividad antimicrobiana forman parte de los primeros experimentos realizados en el CIProVe sobre cepas patógenas, para el testeo y cribaje de biomoléculas y extractos vegetales con posibles actividades inhibitorias del crecimiento bacteriano. Para ello, se seleccionaron las siguientes especies bacterianas: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC27853, *S. aureus* ATCC29213 y *E. faecalis* ATCC 29212.

En la Figura 29. se observan los cultivos de las diferentes cepas de *E. coli* frente a los extractos MoEC, MdEC, MAEC y QEC.

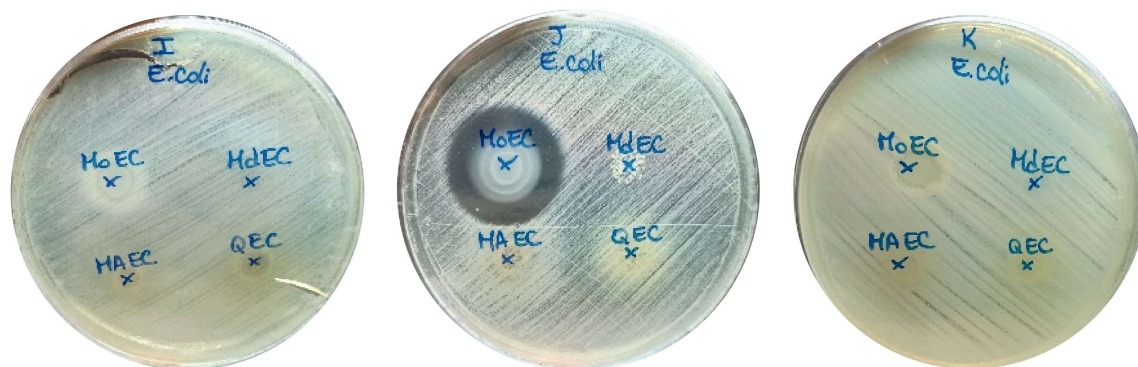


Figura 29: en estas tres placas se sembraron tres cepas diferentes de I) *E. coli*. *E. coli* ATCC 25922, J) *E. coli* ATCC 25923 y K) *E. coli* ATCC 35218 y se enfrentaron a los Extractos Crudos de Moringa MoEC, Morrón amarillo MAEC Morinda MdEC y Quinoa QEC.

Se puede observar con total claridad que hay dos EPVs (MdEC y MAEC) que no muestran ningún tipo de actividad antibacteriana en las concentraciones probadas. Se observa también una clara aparición de halos de inhibición de los extractos crudos de *Moringa oleifera* (MoEC), con distinto grado de sensibilidad en dos de las tres diferentes cepas de *E. coli*

utilizadas, la cepa J (*E. coli* ATCC 25923) y la cepa K (*E. coli* ATCC 35218), en donde el MoEC produce un precipitado blanquecino que en la foto puede confundirse con crecimiento bacteriano. Sobre la cepa I (*E. coli* ATCC 25922) no aparece una imagen clara de inhibición. Por último, el extracto QEC, muestra una sutil inhibición sobre la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

En la Figura 30, se observan los cultivos de *P. aeruginosa* y de *K. pneumoniae* frente a los extractos MoEC, MdEC, MAEC y QEC.

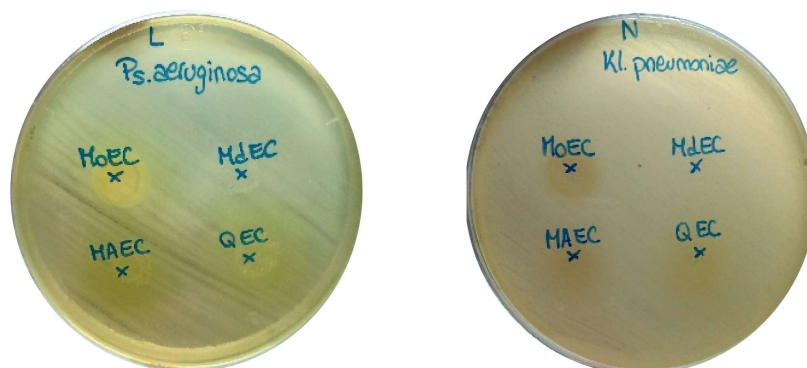


Figura 30: En estas dos placas se sembraron L) *P. aeruginosa* ATCC 27853 y N) *K. pneumoniae* ATCC 700603 y se enfrentaron a los Extractos Crudos de Moringa MoEC, Morrón amarillo MAEC Morinda MdEC y Quinoa QEC.

No se observa en estas placas la aparición de halos de inhibición para las concentraciones ensayadas, tanto en las cepas de *K. pneumoniae* como en la cepa de *P. Aeruginosa*, ambas, especies del grupo de los bacilos Gram negativos.

En la Figura 31. se observan los cultivos de *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* EVR y *S. aureus* ATCC 29213, frente a los extractos MoEC, MdEC, MAEC y QEC.

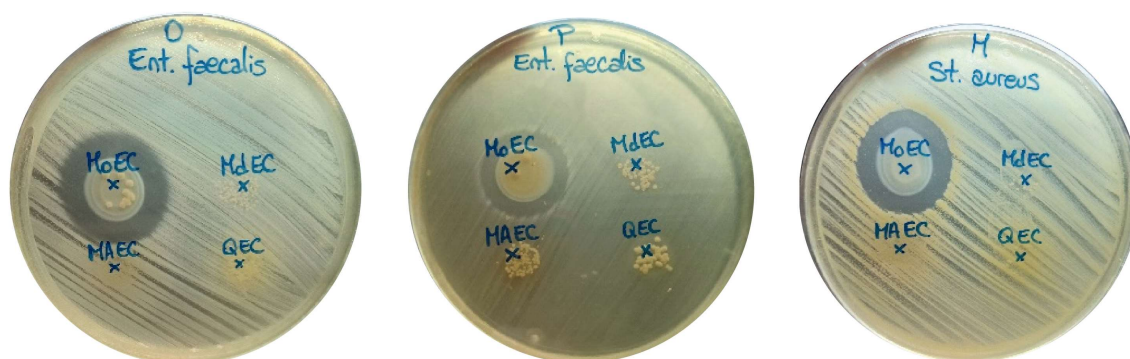


Figura 31: en estas tres placas se sembraron tres cepas diferentes M) *S. aureus* ATCC 29213, P) *E. faecalis* EVR y O) *E. faecalis* ATCC 29212 y se enfrentaron a los Extractos Crudos de Moringa MoEC, Morrón amarillo MAEC, Morinda MdEC y Quinoa QEC.

Se observa la aparición de halos de inhibición en los extractos crudos de *Moringa oleifera*, en las concentraciones probadas, sobre los tres representantes de cocos Gram

positivos testeados en este estudio. Los demás extractos probados en esta placa (MdEC, MAEC y QEC) no demuestran tener ningún grado de inhibición en las concentraciones probadas.

En la Figura 32, se observan los cultivos de las diferentes cepas de *E. coli* frente a los tratamientos térmicos MoTT, MdTT, MATT y QTT.

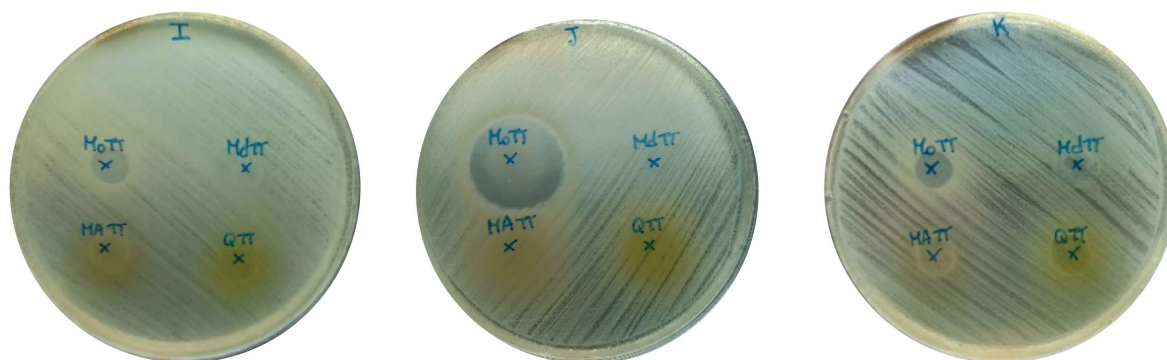


Figura 32: en estas tres placas se sembraron tres cepas diferentes de *E. coli*.

I) *E. coli* ATCC 25922, J) *E. coli* ATCC 25923 y K) *E. coli* ATCC 35218 y se enfrentaron a los Tratamientos térmicos de Moringa MoTT, Morrón amarillo MATT Morinda MdTT y Quinoa QTT.

Se observa con mucha claridad la aparición de halos de inhibición de los tratamientos térmicos de moringa (MoTT), con distinto grado de sensibilidad en las diferentes cepas de *E. coli*, esto no sucedía con igual claridad en la prueba realizada para los extractos crudos. Por otro lado, el extracto de MdTT sugieren una posible inhibición a las concentraciones probadas sobre las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 35218. El extracto QTT mostró una sutil inhibición sobre la cepa *E. coli* ATCC 35218. Por último, el extracto MATT no parece tener ningún grado de inhibición en las concentraciones probadas.

En la Figura 33, se observan los cultivos de *P. aeruginosa* y de *K. pneumoniae* frente a los extractos MoTT, MdTT, MATT y QTT.

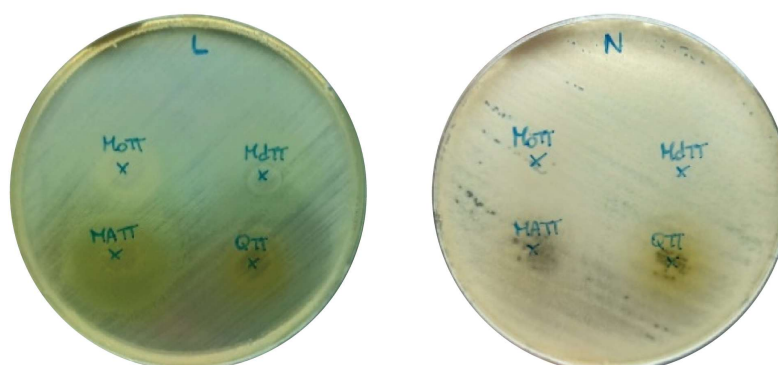


Figura 33: en estas dos placas se sembraron L) *P. aeruginosa* ATCC 27853 y N) *K. pneumoniae* ATCC 700603 y se enfrentaron a los Tratamientos térmicos de Moringa MoTT, Morrón amarillo MATT Morinda MdTT y Quinoa QTT.

Se observa una muy sutil aparición de halos de inhibición de los extractos tratamientos térmicos MATT y QTT sobre las cepas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Pero los extractos MoTT como MdTT, no mostraron ningún grado de inhibición a las concentraciones ensayadas.

En la figura 34. se observan los cultivos de *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* EVR y *S. aureus* ATCC 29213, frente a los extractos MoTT, MdTT, MATT y QTT.

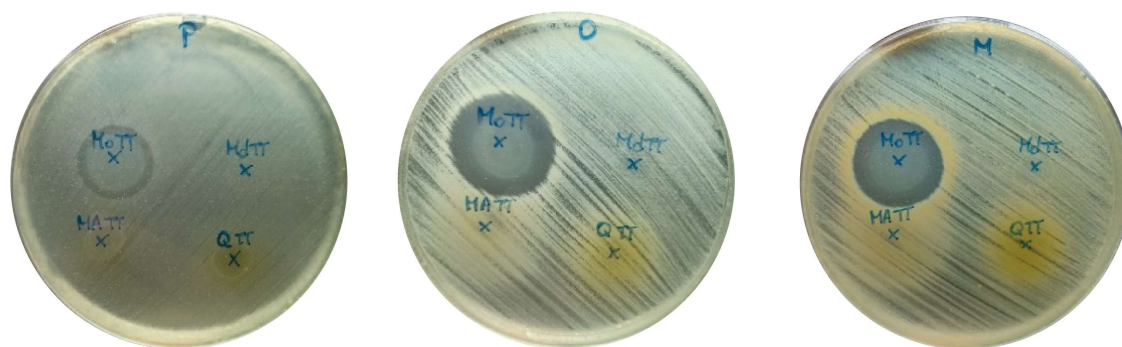


Figura 34: en estas tres placas se sembraron tres cepas diferentes M) *S. aureus* ATCC 29213, P) *E. faecalis* EVR y O) *E. faecalis* ATCC 29212 y se enfrentaron a los Tratamientos térmicos de Moringa MoTT, Morrón amarillo MATT Morinda MdTT y Quinoa QTT.

Se demuestra claramente la aparición de halos de inhibición de los extractos con tratamientos térmicos de *M. oleifera* (MoTT) en las concentraciones probadas, sobre todas las cepas de cocos Gram positivos elegidas para esta investigación. Por otro lado, el extracto de quinoa tratado térmicamente (QTT) evidencia una posible inhibición de *E. faecalis* en su cepa EVR. Los demás extractos no demuestran tener ningún grado de inhibición en las concentraciones probadas.

En la Fig. 35. se observan los cultivos de las diferentes cepas de *Escherichia coli* frente a los extractos ShEC, StEC, GdEC y BnEC.

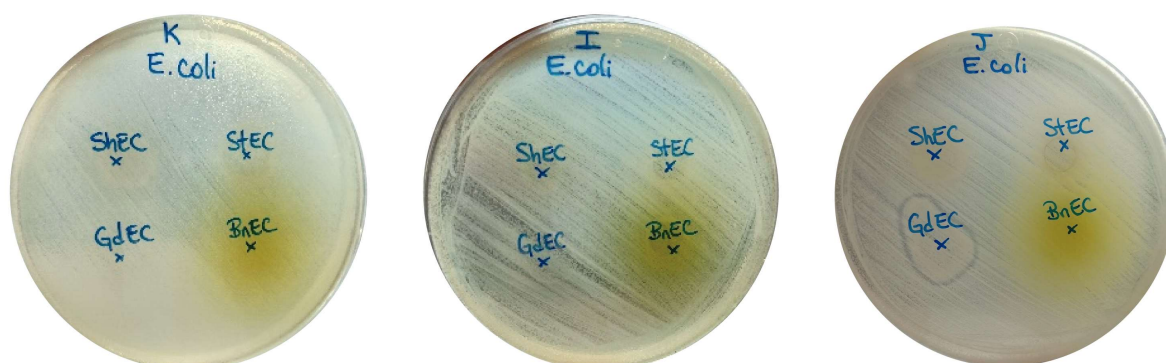


Figura 35: en estas tres placas se sembraron tres cepas diferentes de *E. coli*. I) *E. coli* ATCC 25922, J) *E. coli* ATCC 25923 y K) *E. coli* ATCC 35218, y se enfrentaron a los Extractos crudos de Papa StEC, Chía ShEC Chañar GdEC y Canola BnEC.

Se observa que no hay aparición de halos de inhibición de los cuatro extractos a las concentraciones probadas, sobre ninguna de las tres cepas de *E. coli* ensayadas.

En la Figura 36. se observan los cultivos de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y de *K. pneumoniae* ATCC 700603 frente a los extractos ShEC, StEC, GdEC y BnEC.

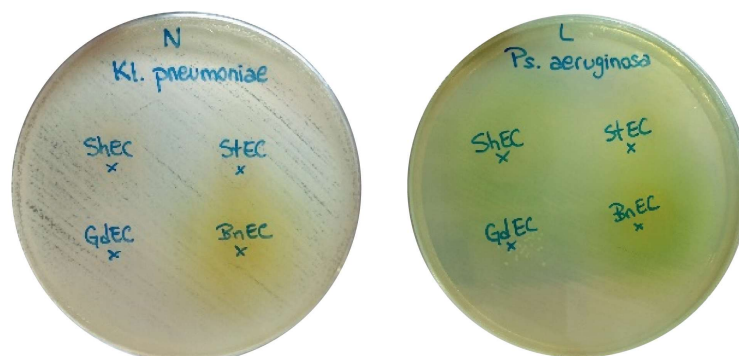


Figura 36: en estas dos placas se sembraron L) *P. aeruginosa* ATCC 27853 y N) *K. pneumoniae* ATCC 700603 y se enfrentaron a los Extractos crudos de Papa StEC, Chía ShEC Chañar GdEC y Canola BnEC.

No se observa la aparición de halos de inhibición en ninguno de los extractos ensayados, tanto en las cepas de *K. pneumoniae* como en la cepa de *P. aeruginosa*, para las concentraciones utilizadas.

En la Figura 37. se observan los cultivos de *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC EVR y *S. aureus* ATCC 29213, frente a los extractos ShEC, StEC, GdEC y BnEC.

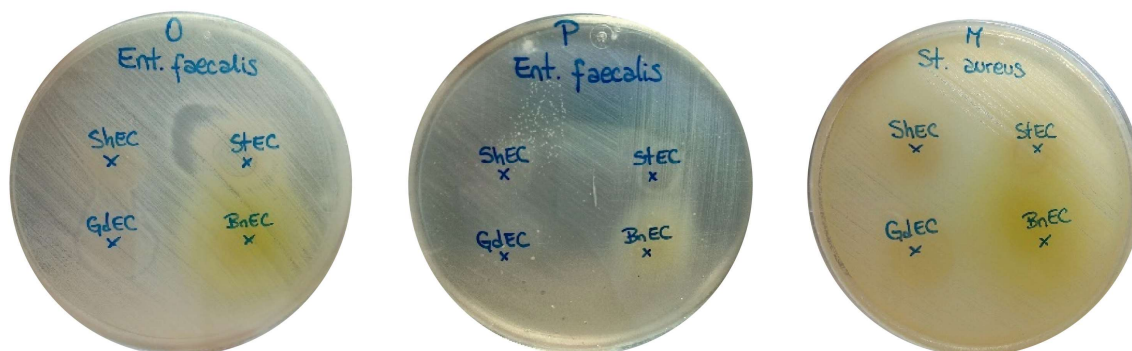


Figura 37: en estas tres placas se sembraron tres cepas diferentes M) *S. aureus* ATCC 29213, P) *E. faecalis* EVR y O) *E. faecalis* ATCC 29212 y se enfrentaron a los Extractos crudos de Papa StEC, Chía ShEC Chañar GdEC y Canola BnEC.

Se observa una pequeña inhibición del extracto StEC sobre la cepa de *E. faecalis* EVR. Para todos los demás extractos testeados, no se observa aparición de halos de inhibición

en ninguno de los otros tres EC en las concentraciones probadas, sobre los tres representantes de cocos Gram positivos elegidos.

En la Figura 38. se observan los cultivos de las diferentes cepas de *Escherichia coli* frente a los extractos ShTT, StTT, GdTT y BnTT.

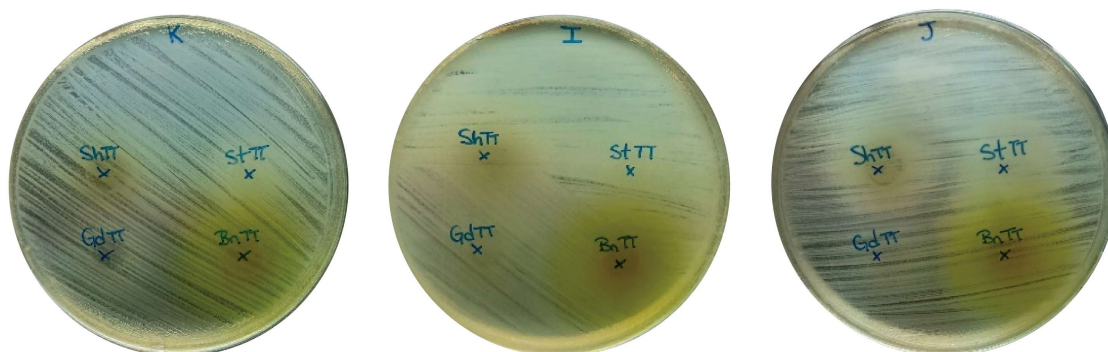


Figura 38: en estas tres placas se sembraron tres cepas diferentes de *E. coli*. I) *E. coli* ATCC 25922, J) *E. coli* ATCC 25923 y K) *E. coli* ATCC 35218 y se enfrentaron a los Tratamientos Térmicos de Papa StTT, Chía ShTT Chañar GdTT y Canola BnTT.

Se puede visualizar con claridad una leve aparición de halos de inhibición para ShTT, GdTT y BnTT, sobre la cepa de *E. coli* ATCC 35218 Además, los extractos ShTT y GdTT, también presentan una sutil inhibición de la cepa de *E. coli* ATCC 25922. Por último, observamos que en el caso de StTT, no se ha visualizado inhibición frente a ninguna cepa de *E. coli*, en la concentración ensayada.

En la Figura 39. se observan los cultivos de *P. aeruginosa* y de *K. pneumoniae* frente a los extractos ShTT, StTT, GdTT y BnTT.



Figura 39: en estas dos placas se sembraron L) *P. aeruginosa* ATCC 27853 y N) *K. pneumoniae* ATCC 700603 y se enfrentaron a los Tratamientos Térmicos de Papa StTT, Chía ShTT Chañar GdTT y Canola BnTT.

No se observa aparición de halos de inhibición para los extractos StTT y GdTT. No obstante, el extracto de papa ShTT y el de canola BnTT, ejercen una actividad antibacteriana frente a ambas cepas testeadas.

En la Figura 40. se observan los cultivos de *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC EVR y *S. aureus* ATCC 29213, frente a los extractos ShTT, StTT, GdTT y BnTT.

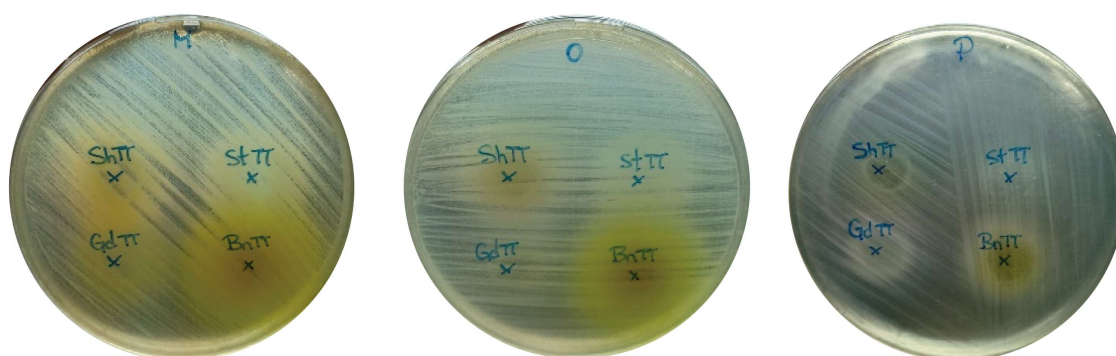


Figura 40: en estas tres placas se sembraron tres cepas diferentes M) *S. aureus* ATCC 29213, P) *E. faecalis* EVR y O) *E. faecalis* ATCC 29212 y se enfrentaron a los Tratamientos Térmicos de Papa StTT, Chía ShTT Chañar GdTT y Canola BnTT.

No se observa aparición de halos de inhibición, en las concentraciones probadas, sobre las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y de *E. faecalis* ATCC 29212. No obstante, se observa tenuemente un halo de inhibición del crecimiento en la cepa de *E. faecalis* EVR para los extractos tratamientos térmicos de Chía, Chañar y Canola (ShTT, GdTT y BnTT). Por último, el extracto StTT no muestra inhibición sobre ninguna de las tres cepas.

Queda planteado, para futuras investigaciones, la posibilidad de repetir la actividad antimicrobiana en medio sólido, con los extractos de ShTT, GdTT, BnTT, MAEC y QEC, sometidos a nuevos y mayores procesos, para lograr una mayor concentración de sus biomoléculas.

De todas maneras, en el presente trabajo, haremos hincapié en las muestras de MoEC y MoTT, ya que fueron las que dieron halos de inhibición más claros y contundentes.

2.6.2. Ensayos de inhibición de los extractos sobre el crecimiento bacteriano en medios líquidos.

Para confirmar por una metodología diferente los resultados obtenidos en medio sólido y acceder a información complementaria y cuantificable, se realizaron ensayos en caldos de cultivo bacterianos (medios líquidos). De esta manera se lograría estimar algunos factores cinéticos con mayor precisión y escindirnos absolutamente del problema de la posible

dificultad en la difusión que presentan los medios gelificados, teniendo en cuenta que, en estos medios, la difusión de las moléculas varía mucho en función del tamaño de las mismas, y que, en medio líquido, esto no suele presentar ninguna problemática.

Debido a que en medios líquidos se pueden calcular las IC₅₀ también nos sirven para estimar este parámetro. Por tal motivo, se realizó el testeo en medio líquido, de todos los EPVs que presentaron actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano en el tamizaje realizado en medio sólido.

De los resultados obtenidos solo se pudo obtener parámetros de inhibición para algunas bacterias con los extractos de Moringa. Tanto MoEC como MoTT eran las muestras que, en las pruebas en medio sólido, presentaban mayores halos de inhibición. Estos extractos mostraron mayor potencia inhibitoria, por lo que sería interesante estudiar cuáles son sus moléculas biológicamente activas, en este caso, aquellas que poseen dicha actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano.

Los demás extractos que presentaron actividad en medio sólido fueron: ShTT, GdTT, BnTT, MAEC y QEC. Dichos extractos habían sido concentrados por goteos y secados sucesivos, pero apenas mostraron tímidos indicios de inhibición. Se hace evidente que dichas muestras no llegaban a concentraciones inhibitorias al diluirse en los caldos de crecimiento (medios de cultivos líquidos). Por lo que sus resultados en medio líquido resultaron imperceptibles.

A continuación, se mostrarán solo algunos de los resultados obtenidos para los EPVs (MoEC y MoTT) cuando fueron incubados en medio líquido con las siguientes bacterias: *E. coli* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212.

• **Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos de Moringa**

Ya que moringa ha resultado ser una muestra promisorio e interesante para la búsqueda de moléculas naturales con actividad antibacteriana, se ha decidido probar en medio líquido, incluso con aquellas bacterias que en medio sólido no han sido perceptibles halos de inhibición.

Se prepararon las placas según la metodología descrita en la Sec. 2.9.2., para llegar a las siguientes concentraciones finales de MoEC: A1, A2 y A3: 281,3 µg/mL; B1, B2 y B3: 140,65 µg/mL; C1, C2 y C3: 70,32 µg/mL; D1, D2 y D3: 35,16 µg/mL; E1, E2 y E3: 17,08 µg/mL; F1, F2 Y F3: 8,54 µg/mL; G1, G2 y G3: 4,27 µg/mL; y control del crecimiento bacteriano H1, H2 y H3.

De manera similar, pero utilizando MoTT, las concentraciones finales fueron de: A4, A5 y A6: 209,0 µg/mL; B4, B5 y B6: 104,5 µg/mL; C4, C5 y C6: 52,3 µg/mL; D4, D5 y D6: 26,1 µg/mL; E4, E5 y E6: 13,1 µg/mL; F4, F5 y F6: 6,5 µg/mL; G4, G5 y G6: 3,3 µg/mL y control del crecimiento bacteriano H4, H5 y H6.

- **Inhibición de *S. aureus* ATCC 29213 en medio líquido frente a MoEC:**

Tal cual lo esperado, por los halos previamente observados en los ensayos en medio sólido, se observa inhibición en medio líquido y al graficar los porcentajes de inhibición producidos sobre la bacteria *S. aureus* ATCC29213, probada frente a las diluciones seriadas de MoEC, podemos estimar que la IC₅₀ cercano a un valor de 52.3 µg/mL. Fig. 41.

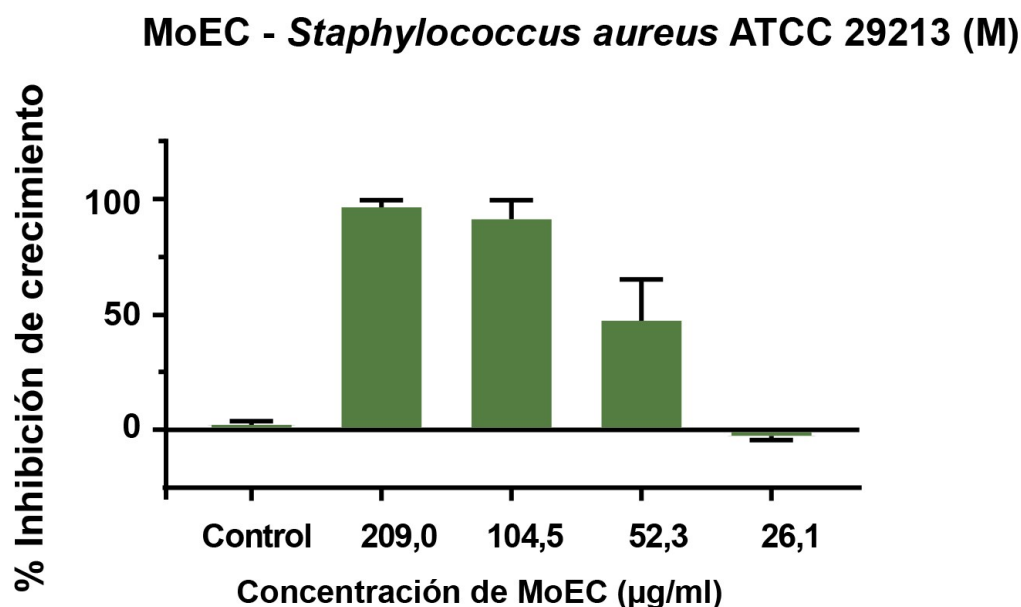


Fig. 41: Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano que producen las diluciones seriadas de MoEC (*Moringa oleifera* Extracto Crudo) al enfrentarse a *S. aureus* ATCC 29213.

• **Inhibición de *S. aureus* ATCC 29213 en medio líquido frente a MoTT:**

Al graficar los porcentajes de inhibición producidos sobre la bacteria *S. aureus* ATCC29213, probada frente a las diluciones seriadas de MoTT, se puede demostrar que se produce una inhibición de casi el 90 % al probarse la inhibición a una concentración de 281,3 µg/mL. También, se puede observar de los datos que, en concentraciones de 70,35 µg/mL, el porcentaje de inhibición cercano al 60 % (Fig. 42). Estos resultados, al igual que en el caso del extracto crudo, se puede correlacionar perfectamente a los resultados observados para los ensayos en medio sólido.

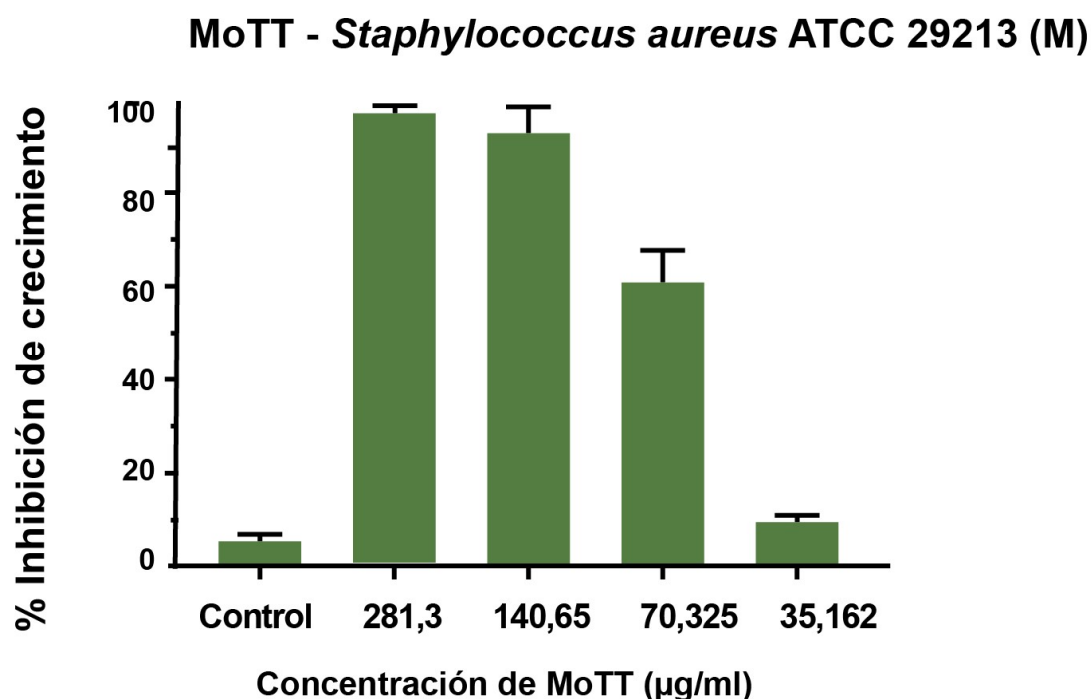


Fig. 42. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano que producen las diluciones seriadas de MoTT (*Moringa oleifera* Tratamiento Térmico) al enfrentarse a *S. aureus* ATCC29213.

Nuevamente vemos que parte de la actividad antimicrobiana de los extractos se pierde al realizar el tratamiento térmico.

• **Inhibición de *E. faecalis* ATCC 29212 en medio líquido frente a MoEC:**

Al graficar los porcentajes de inhibición producidos sobre la bacteria *E. faecalis* ATCC 29212, probada frente a las diluciones seriadas de MoEC, podemos observar que la IC₅₀ cercano a un valor de 26,1 µg/mL (Fig. 43). Al igual a lo observado en las pruebas realizadas en medio sólido, podemos constatar la actividad antibacteriana de este extracto de moringa.

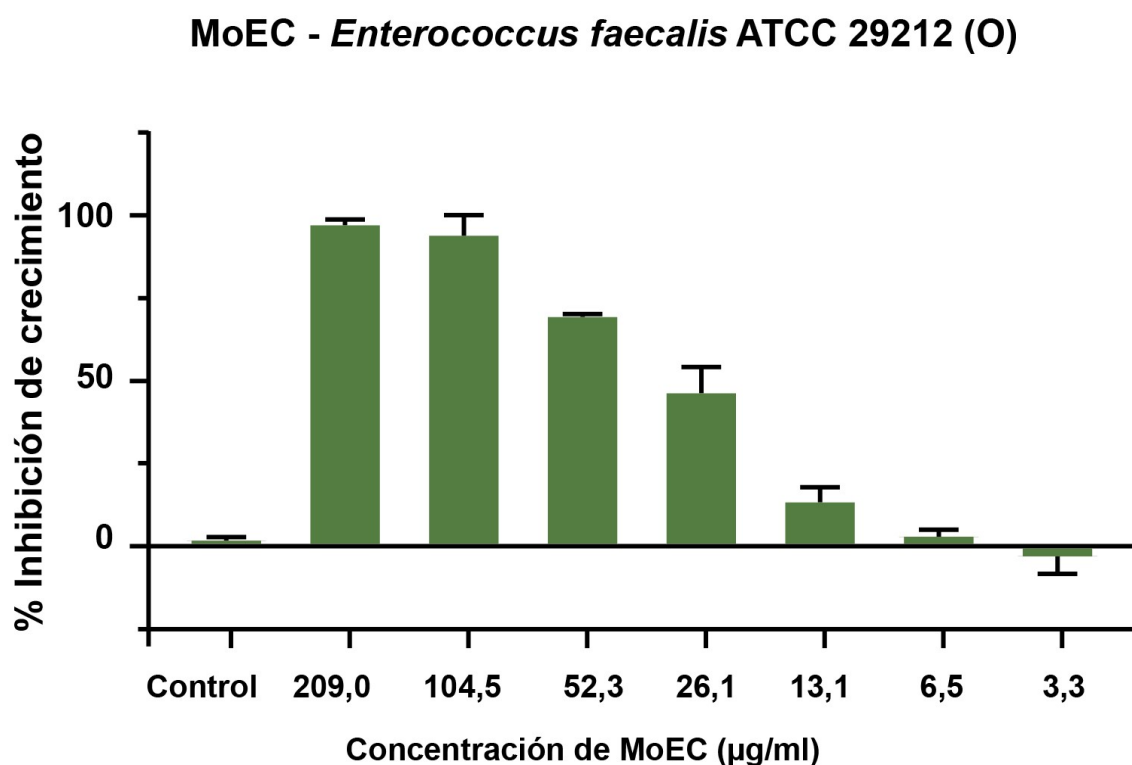


Fig. 43. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano que producen las diluciones seriadas de MoEC al enfrentarse a *E. coli* ATCC25923.

- **Inhibición de *E. faecalis* ATCC 29212 en medio líquido frente a MoTT:**

Al graficar los porcentajes de inhibición producidos sobre la bacteria a *E. faecalis* ATCC29212 probada frente a las diluciones de MoTT, podemos estimar una IC₅₀ cercana a un valor de 160 µg/mL (Fig. 44).

Se ve que este resultado, es congruente con los observado en medio sólido para este extracto MoTT, que también logró inhibir a dicha cepa.

Es evidente que, durante el tratamiento térmico, se deben perder ciertas sustancias en el extracto de Moringa MoEC, que tienen actividad inhibitoria contra *E. faecalis* ATCC29212, por lo que la IC₅₀ para MoEC es menor que para MoTT.

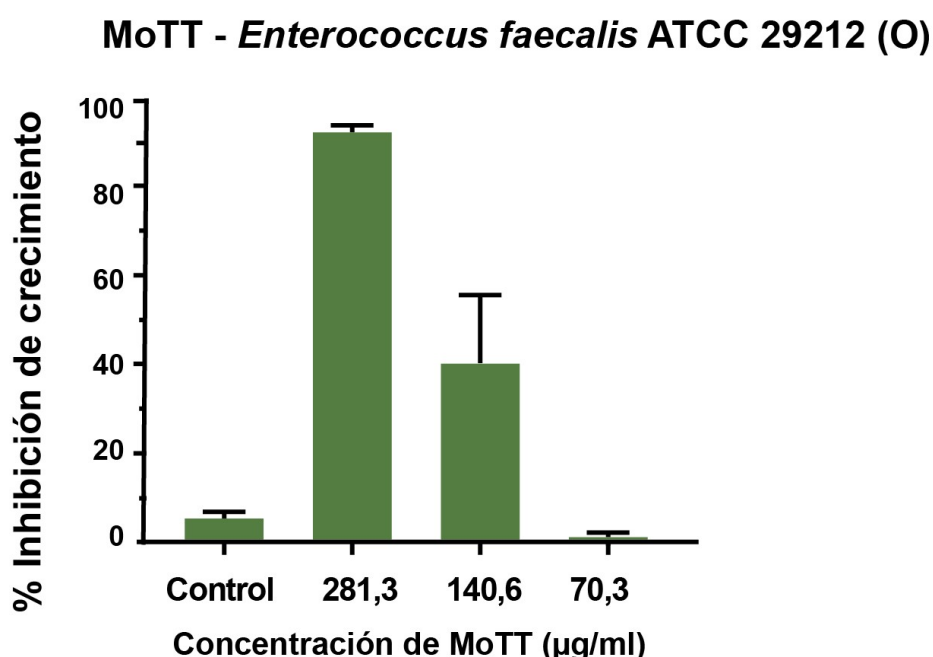


Fig. 44. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano que producen las diluciones seriadas de MoTT al enfrentarse a *E. faecalis* ATCC29212.

- **Inhibición de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en medio líquido frente a MoEC y MoTT.**

Al igual que los resultados obtenidos en medio sólido, no se pudo evidenciar inhibición de *P. aeruginosa* por parte de ambos extractos de *Moringa oleífera* (MoEC y MoTT) en medio líquido. Este resultado era esperable y ha servido como corroboración del resultado primeramente encontrado en medio sólido.

- **Inhibición de *K. pneumoniae* ATCC 700603 en medio líquido frente a MoEC y MoTT.**

Al igual que los resultados obtenidos para *P. aeruginosa* ATCC 27853, no se evidenció inhibición del crecimiento en medio líquido. Estos resultados se condicen con los obtenidos en la metodología en medio sólido para esta misma cepa.

- **Inhibición de *E. coli* ATCC 25923 en medio líquido frente a MoEC y MoTT.**

Al graficar los porcentajes de inhibición producidos sobre la bacteria *E. coli* ATCC25923, probada frente a las diluciones seriadas de MoEC, podemos observar que la IC₅₀ tiene un valor cercano a 26,1 µg/mL (Fig. 45).

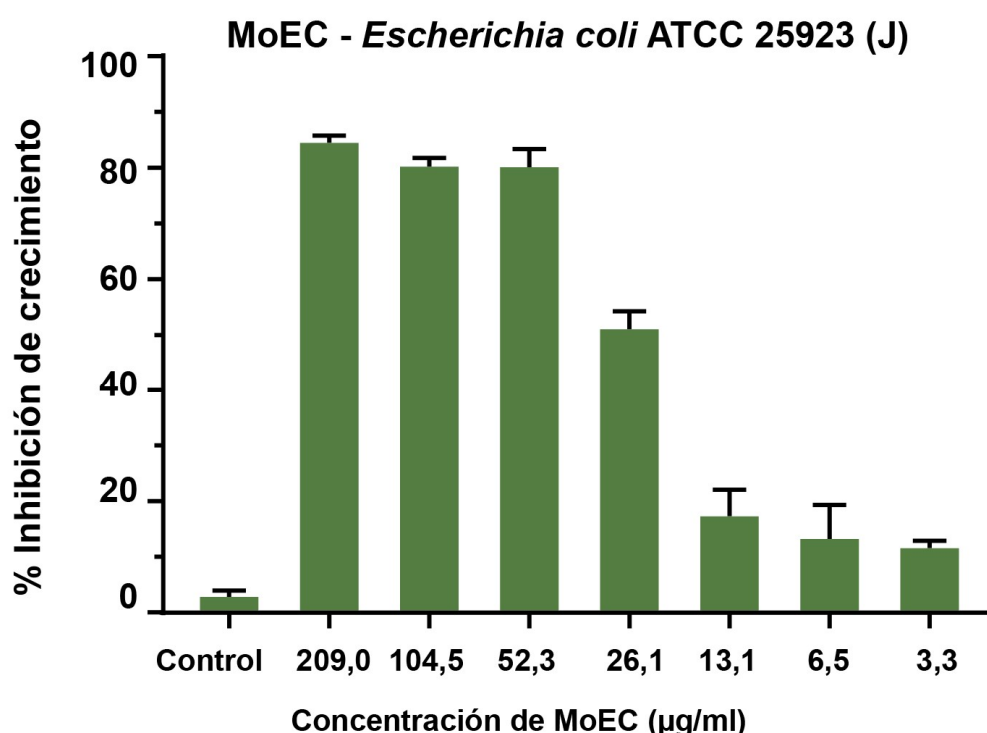


Fig. 45. Se grafican los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano que producen las diluciones seriadas de MoEC al enfrentarse a *E. coli* ATCC25923.

Era esperable, por los resultados previamente encontrados en los ensayos en medio sólido, que este extracto produjera inhibición sobre esta cepa de *E. coli*.

Al graficar los porcentajes de inhibición producidos sobre la bacteria *E. coli* ATCC25923, probada frente a las diluciones seriadas de MoTT, se puede estimar una IC₅₀ cercana a un valor de 170 µg/mL (Fig. 46). Podemos corroborar los resultados obtenidos para este extracto, que demuestran su capacidad inhibitoria frente a la cepa de *E. coli* estudiada.

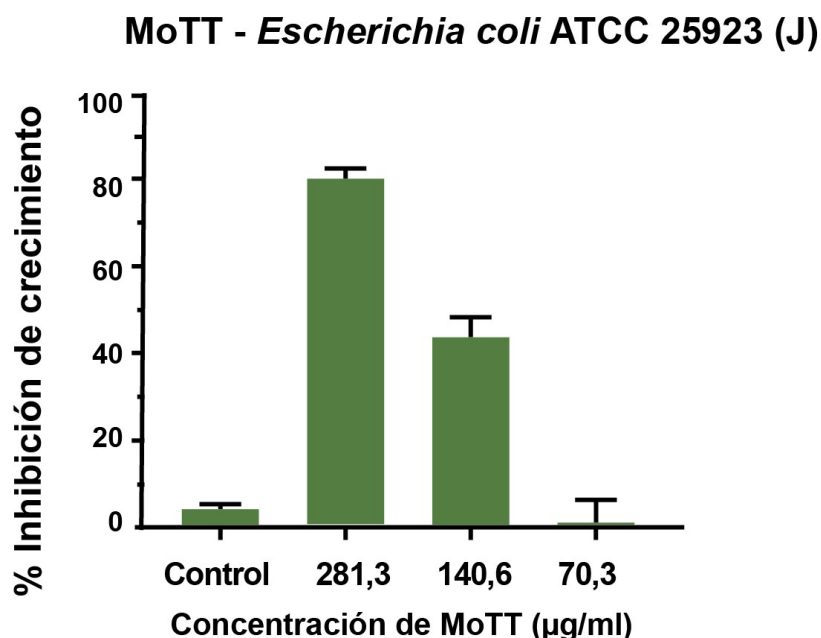


Fig. 46. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano que producen las diluciones seriadas de MoTT al enfrentarse a *E. coli* ATCC25923.

Es evidente que, durante el tratamiento térmico, se deben perder ciertas sustancias en el extracto de Moringa MoEC, que tienen actividad inhibitoria contra *E. coli* ATCC25923, por lo que la IC₅₀ para MoEC es menor que para MoTT.

Finalmente, en este último ensayo se muestra el resultado de la coloración con resazurina luego de 20h de incubación para todos los pocillos de cultivo. Se puede observar visualmente los pocillos con coloración que va desde el rosado (células viables) hasta el color violeta (células muertas). La última concentración que se observan células vivas en el MoEC corresponde a 26,1 $\mu\text{g/mL}$ y la última concentración en la que se observa crecimiento en el MoTT es de 140,65 $\mu\text{g/mL}$, ambas con coloración rosada.

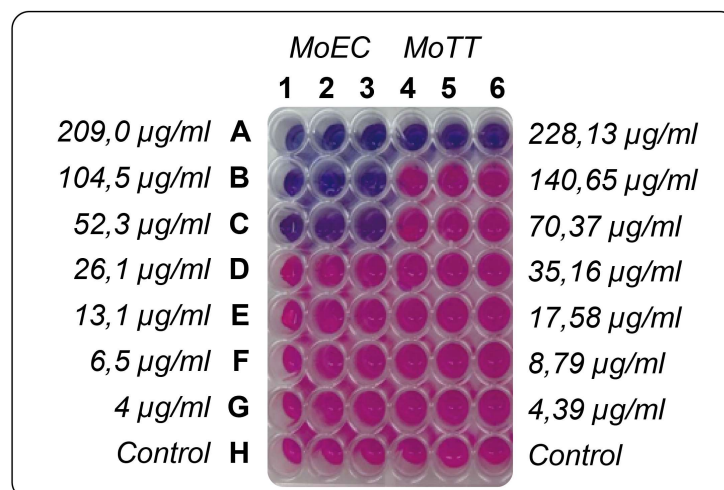


Fig. 47: Armado de la placa de Elisa para los ensayos de sensibilidad en medio líquido. En las columnas 1, 2 y 3 se utiliza como potencial inhibidor MoEC, al que se coloca en una concentración de 209,0 $\mu\text{g/mL}$, en la fila A, hasta llegar por medio de diluciones seriadas, hasta una concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ en la fila G. Por otro lado, en las filas 4, 5 y 6, El potencial inhibidor a testear es MoTT, el cual se coloca en concentraciones de 228.13 $\mu\text{g/mL}$ en la fila A, realizando diluciones seriadas hasta llegar a valores de 4.39 $\mu\text{g/mL}$ en la fila G. Toda la fila H se deja sin inhibidor como control de la cepa bacteriana, en este caso *E. coli* ATCC 25923. De esta manera conseguimos valores por triplicado para la inhibición producida por cada extracto a testearse. Luego de realizarse el cultivo y la lectura de las placas a 630 nm se agrega Resazurina para el revelado visual de los resultados (Cap. 2 Sec. 1.8.2.).

2.6.3. Ensayos de actividad intrínseca y potencial sinergismo de los diferentes EPVs sobre bacterias con mecanismo de resistencia inducibles. En medio sólido.

En la realización de estos ensayos se enfrentaron los 16 EPVs frente a dos cepas propuestas *Klebsiella pneumoniae* con mecanismo BLEE y *Acinetobacter baumannii* con el mecanismo de carbapenemasas. De los resultados obtenidos se constató que solo las muestras de *Moringa oleífera* (MoEC y MoTT) y de *Morinda citrifolia* (MdEC y MdTT) mostraban actividad inhibitoria intrínseca del crecimiento sobre dichas cepas bacterianas, evidenciándose con un halo de inhibición (Figs. 53-60).

Además, las muestras de MoEC y de MoTT no sólo mostraron actividad inhibitoria intrínseca (*per se*), sino también mostraron actividad sinérgica con los antibióticos de control (CAZ, CTX y CFO).

Para los otros 12 EPVs solo se podía observar inhibición en las placas por los antibióticos utilizados como control, pero no tenían actividad antibacteriana intrínseca sobre las cepas bacterianas estudiadas en este ensayo, ni tampoco mostraron signos de sinergismo para la inhibición de los mecanismos de resistencia planteados.

Por tal motivo, en este segmento se muestran solo los resultados obtenidos para los extractos de MdEC, MdTT, MoEC y MoTT, para explicar el modo de interpretación de las placas de agar, y observar las características de la variedad de comportamientos que podemos encontrar cuando se busca inhibición de mecanismos de resistencia por sinergismo.

En una placa de cultivo (MH) se sembró una cepa de *Klebsiella pneumoniae* con mecanismo BLEE, junto con los tres discos habituales de Cefotaxima (CAZ), Cefotaxima (CTX) y Cefoxitina (CFO), formando un triángulo isósceles a 10 mm de los bordes. En el centro de la placa se colocaron 200 µL de a gotas de 20 µL del EPV a testear en lugar de los clásicos inhibidores, ácido clavulánico y ácido Borónico. Se incubó 24 h. a 37 °C.

En otra placa de cultivo (MH) se sembró una cepa de *Acinetobacter baumannii* con el mecanismo de carbapenemasas. Repetimos la misma técnica, pero utilizando solo dos antibióticos carbapenemes, Meropenem (MRP), e Imipenem (IMI) y utilizamos en lugar del EDTA a los EPVs a testear. El EPV fue sembrado en el centro de la placa tal como se describió en el párrafo anterior.

Ambas placas fueron diseñadas en base a las recomendaciones de la red WHONET.

- **Actividad de los extractos de *Morinda citrifolia*.**

En una primera etapa se enfrentaron los extractos de *Morinda citrifolia* a las tres cefalosporinas (CAZ, CTX y CFO), en una placa inoculada con *K. pneumoniae* BLEE (+).



Figura 48: Cultivo en placa sembrado con *K. pneumoniae* BLEE (+). En el punto central de la misma se sembró MdEC (visualizado en verde claro en la foto de la derecha). El testeó se realizó en presencia de CAZ, CTX y CFO (las cuales se delimitan sus halos de inhibición en verde oscuro en la foto de la derecha). Ambas fotos pertenecen al mismo cultivo, siendo la foto de la izquierda la original, mientras que, en la foto de la derecha, fueron delineados sobre la fotografía los halos de inhibición producidos, para simplificar la correcta interpretación del ensayo.

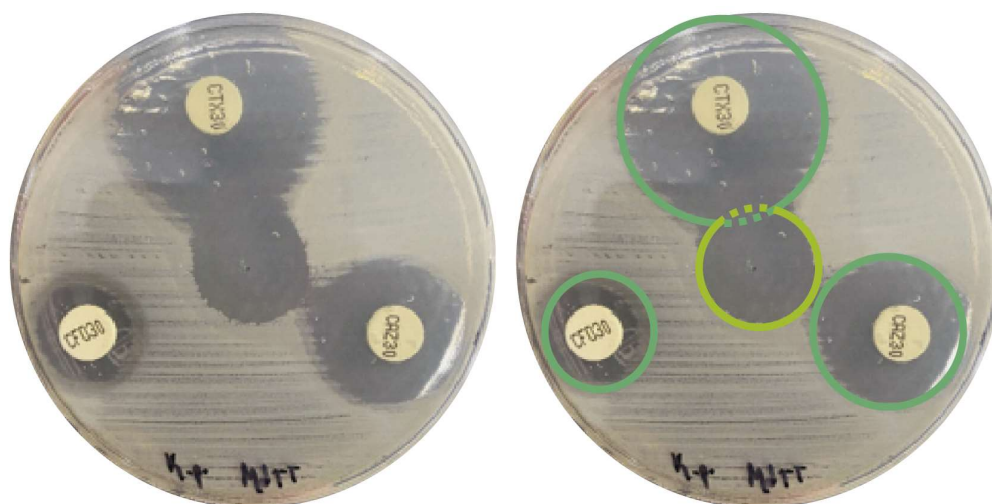


Figura 49: Cultivo en placa sembrado con *K. pneumoniae* BLEE (+). En el punto central de la misma se sembró MdTT (visualizado en verde claro en la foto de la derecha). El testeó se realizó en presencia de CAZ, CTX y CFO (las cuales se delimitan sus halos de inhibición en verde oscuro en la foto de la derecha). Ambas fotos pertenecen al mismo cultivo, de la misma manera que fuera explicado para la Fig. 53.

Se puede observar en las Figs. 48 y 49 que tanto los antibióticos (en verde oscuro), como los extractos (en verde claro), han generado halos de inhibición casi perfectamente

circulares, pero no se evidencia de ninguna manera que, en los puntos de posible interacción, se puedan visualizar deformaciones en los halos, por lo que no es esperable un efecto de sinergismo de inhibición de las BLEE de la *K. pneumoniae*, por parte de los EPVs (Figs. 48, 49).

Posteriormente, en una segunda etapa, se enfrentaron los extractos de Morinda a los dos carbapenemes, en una placa inoculada con *A. baumannii* carbapenemasas (+).

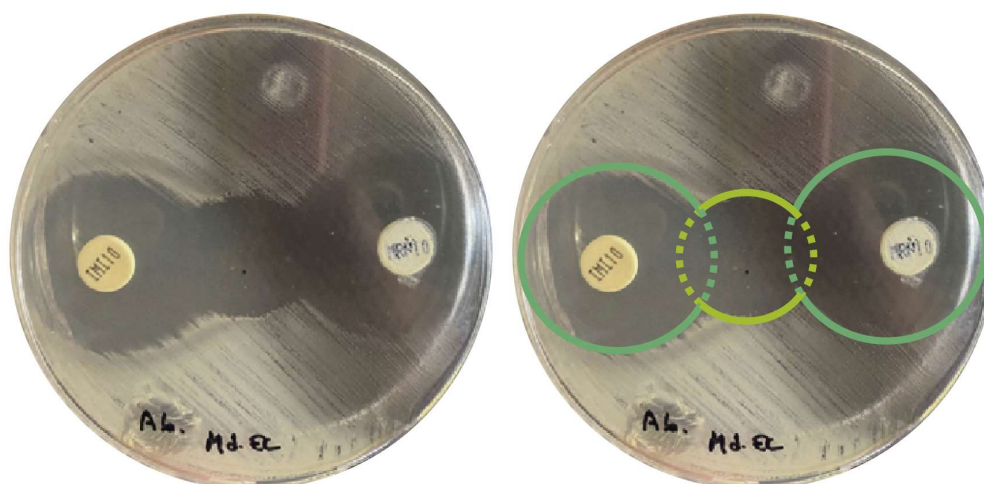


Figura 50. Cultivo en placa sembrado con *A. baumannii* carbapenemasas (+). En el punto central de la misma se sembró MdEC (visualizado en verde claro en la foto de la derecha). El testeo se realizó en presencia de IMI, MRP (las cuales se delimitan sus halos de inhibición en verde oscuro en la foto de la derecha). Ambas fotos pertenecen al mismo cultivo, de la misma manera que fuera explicado para la Fig. 48.

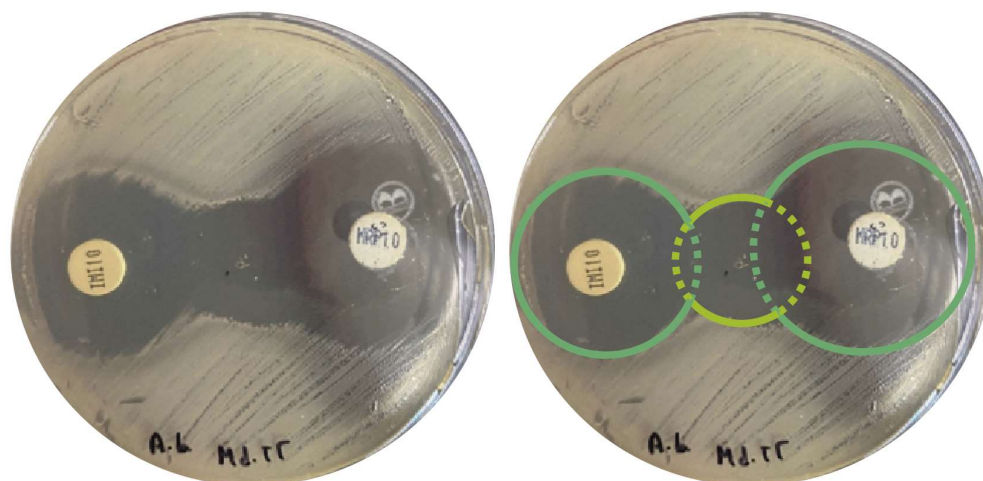


Figura 51: Cultivo en placa sembrado con *A. baumannii* carbapenemasas (+). En el punto central de la misma se sembró MdTT (visualizado en verde claro en la foto de la derecha). El testeo se realizó en presencia de IMI, MRP (las cuales se delimitan sus halos de inhibición en verde oscuro en la foto de la derecha). Ambas fotos pertenecen al mismo cultivo, de la misma manera que fuera explicado para la Fig. 48.

Podemos observar que tanto los antibióticos como los extractos, nuevamente han generado halos de inhibición casi perfectamente circulares, pero tampoco vemos que, en los puntos de posible interacción, se puedan visualizar deformaciones en los halos (en verde oscuro), esto nos sugiere, que no es esperable un efecto de sinergismo por inhibición de la Carbapenemasas presente en la *A. baumannii*, por parte de los EPVs (Figs. 50, 51).

- **Ensayos de Posible sinergismo sobre extractos de Moringa**

Se enfrentaron los extractos de Moringa, MoEC y MoTT, a las tres cefalosporinas de testeo (CTX, CAZ y CFO), en dos placas inoculada con *K. pneumoniae* BLEE (+). Los resultados se muestran en las Figuras 52 y 53.

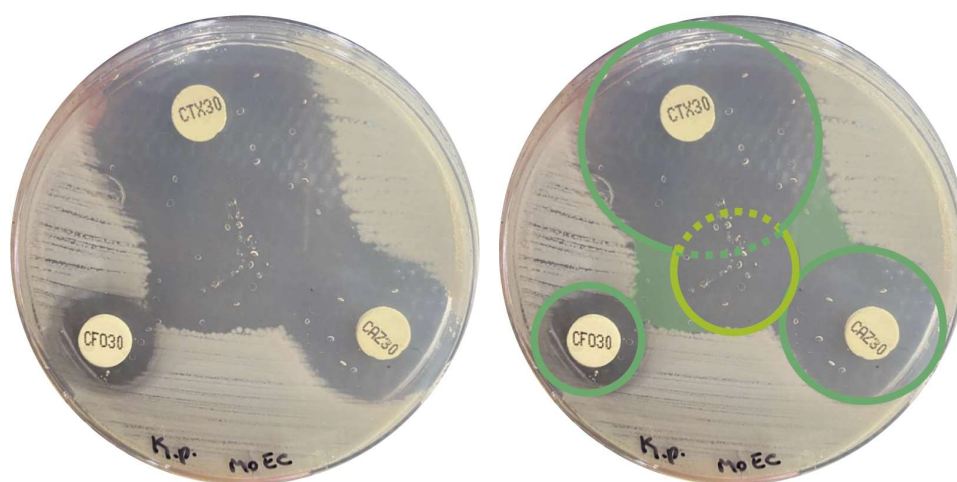


Figura 52: Placa de agar MH inoculada con una cepa de *K. pneumoniae* BLEE (+). En el punto central de la placa se sembró MoEC (en verde claro), para testear frente a CAZ, CTX y CFO (halos demarcados en verde oscuro). Las deformaciones en los halos observados (áreas sombreadas en verde), sugerirían que MoEC ejerce un mecanismo de inhibición de estas BLEE. Ambas fotos pertenecen a la misma placa, pero la foto de la izquierda es la original, mientras que en la foto de la derecha se demarcaron sobre la fotografía los halos de inhibición producidos y las áreas deformadas, para lograr una correcta interpretación del ensayo.

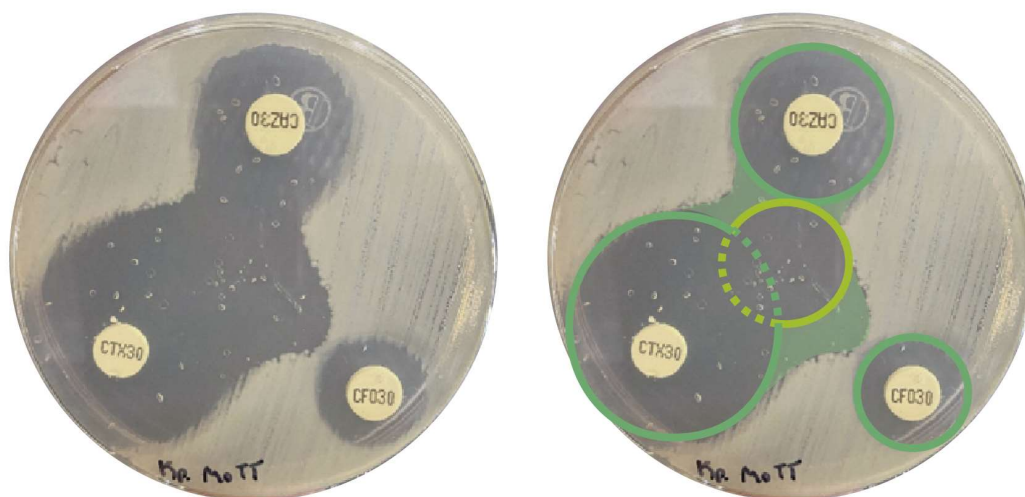


Figura 53: Placa de agar MH inoculada con una cepa de *K. pneumoniae* BLEE (+). En el punto central de la placa se sembró MoTT (en verde claro), para testear frente a CAZ, CTX y CFO (halos demarcados en verde oscuro). Las deformaciones en los halos observados (áreas sombreadas en verde), sugerirían que MoTT ejerce un mecanismo de inhibición de estas BLEE. Ambas fotos pertenecen al mismo cultivo, de la misma manera que fuera explicado para la Fig. 52.

Se puede observar, que tanto los antibióticos como los extractos MoEC y MoTT, han generado halos de inhibición intrínseca (en verde claro), lo cual es un resultado muy interesante en sí mismo. Pero, además, lo que es sumamente interesante, es que en las áreas de posible interacción de los EPVs con los antibióticos (pintadas de color violeta), se pueden visualizar deformaciones en los halos (en verde oscuro), que no eran visibles en las figuras 48. y 49., en las que se usaron los mismos antibióticos (CAZ, CTX y CFO) frente a la misma cepa bacteriana, pero con otros extractos. Por lo que posiblemente nos encontremos frente a un efecto de sinergismo por inhibición de las BLEE de la *K. pneumoniae*, por parte de los EPVs de *Moringa oleifera* (Figs. 52 y 53).

Posteriormente, se enfrentaron los extractos de Moringa a los dos carbapenemes, en una placa inoculada con *A. baumannii* carbapenemasas (+).

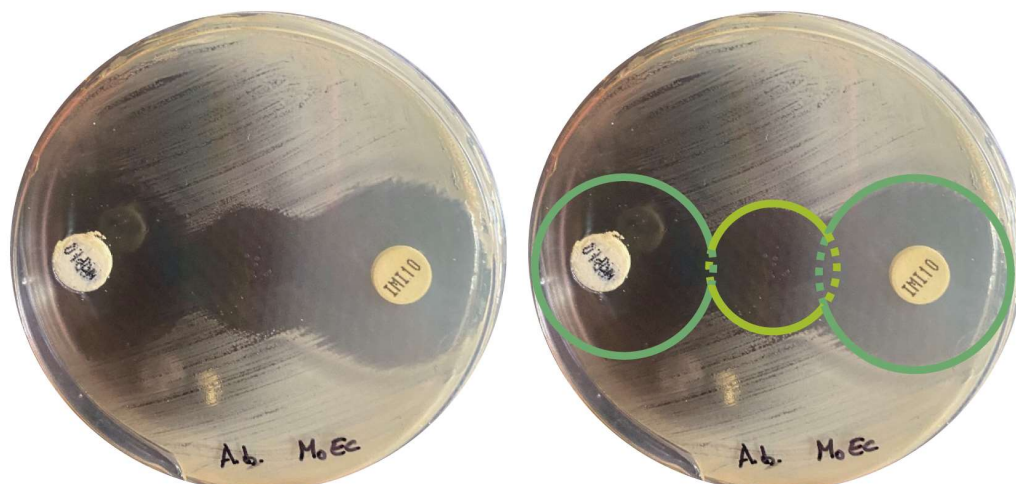


Figura 54. Cultivo en placa sembrado con *A. baumannii* carbapenemasas (+).

En el punto central de la misma se sembró MoEC (visualizado en verde claro en la foto de la derecha). El testeo se realizó en presencia de IMI, MRP (las cuales se delimitan sus halos de inhibición en verde oscuro en la foto de la derecha).

Ambas fotos pertenecen al mismo cultivo, de la misma manera que fuera explicado para la Fig. 50.

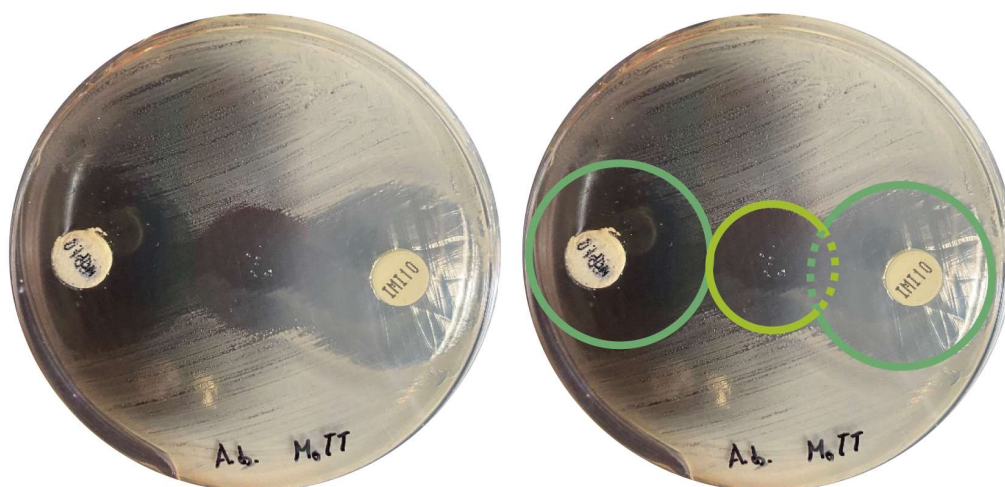


Figura 55. Cultivo en placa sembrado con *A. baumannii* carbapenemasas (+). En el punto central de la misma se sembró MoTT (visualizado en verde claro en la foto de la derecha). El testeo se realizó en presencia de IMI, MRP (las cuales se delimitan sus halos de inhibición en verde oscuro en la foto de la derecha). Ambas fotos pertenecen al mismo cultivo, de la misma manera que fuera explicado para la Fig. 50.

Nuevamente, podemos observar que tanto los antibióticos como los extractos MoEC y MoTT, han generado halos de inhibición casi perfectamente circulares (en verde oscuro), pero no vemos que, en los puntos de posible interacción, se puedan visualizar deformaciones en estos halos, esto indicaría, que no es esperable un efecto de sinergismo por inhibición de

la Carbapenemasas presente en la *A. baumannii*, por parte de los EPVs de moringa (Figs. 54 y 55).

2.6.4. Ensayos de actividad intrínseca y potencial sinergismo de sobre bacterias con mecanismo de resistencia inducibles. En medio líquido.

Para confirmar los resultados anteriores en agar (medio sólido) por una metodología diferente y acceder a información complementaria se realizaron ensayos en caldos de cultivo bacterianos (medios líquidos). Para ello, se trabajó con una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE, y una cepa de *A. baumannii* productora de Carbapenemasas, como modelos para probar la posible inhibición de mecanismos de resistencia inducibles a antibióticos.

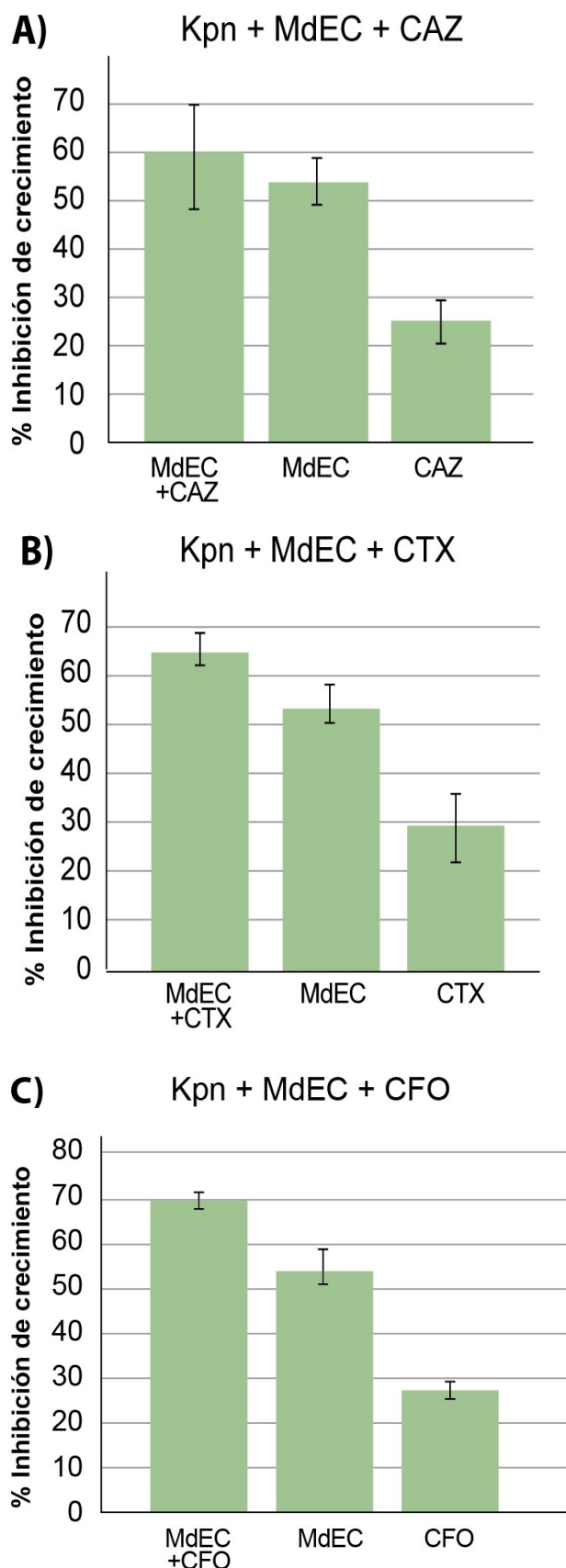
Como habíamos dicho anteriormente en cultivo sólido, volvemos a implementar las recomendaciones de la red WHONET adaptándolas al medio líquido. En estas nuevas pruebas no se pueden observar cambios en los halos de inhibición, alargamientos o achatamientos. Por lo que, a través de mediciones espectrofotométricas, se evaluaron los porcentajes de inhibición que se producían en medios de cultivo al ser adicionados con antibióticos solos, con EPVs solos y/o con medios donde se usaron combinaciones de EPVs y antibióticos, lo que permitió evaluar con datos numéricos los resultados obtenidos.

Por tanto, y para clarificar los posibles resultados que podemos encontrar, se evaluaron tres actividades en cada experimento:

1. La actividad inhibitoria intrínseca de los EPVs frente a las diferentes cepas bacterianas con mecanismos de resistencia. Lo que se visualizará como un valor % de inhibición de la cepa bacteriana por el agregado del EPV al pocillo de crecimiento.
2. La actividad inhibitoria de los antibióticos comerciales, sobre la cepa bacteriana con mecanismo de resistencia.
3. La actividad inhibitoria sinérgica de los EPVs al combinarse con los antibióticos de screening para los diferentes mecanismos presentados.

- Testeo de las actividades inhibitorias de los extractos de *Morinda citrifolia*.

Análisis de la actividad antibacteriana de MdEC frente a *K. pneumoniae* (BLEE+).

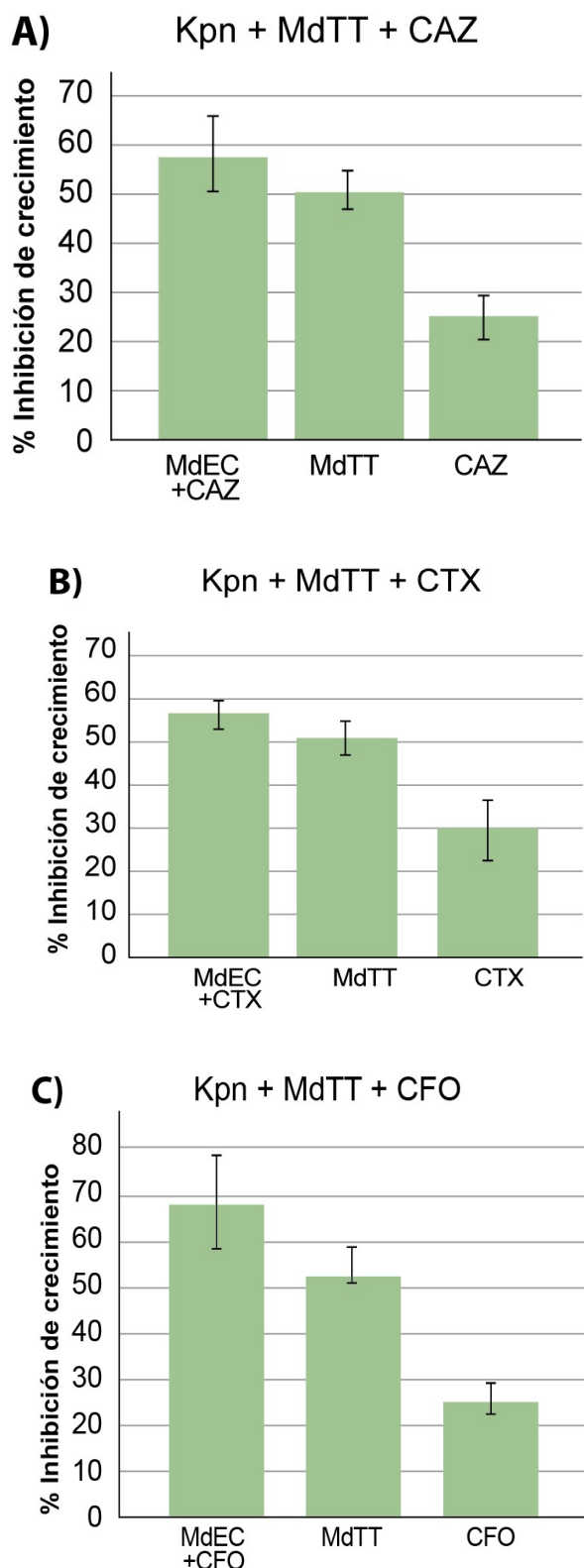


Con los resultados observados se puede inferir un cierto grado de inhibición del extracto MdEC (cercano al 53%) sobre la cepa de *K. pneumoniae*, con lo cual confirmamos su **actividad inhibitoria intrínseca**. Al probarse los porcentajes de inhibición de los antibióticos (CAZ, CTX o CFO), dentro del rango del 25 al 35%. Sin embargo, no se observa presencia de sinergismo debido a la combinación del EPV (MdEC) con los antibióticos de screening utilizados, ya que ninguna de dichas combinaciones supera el 80% de inhibición (Fig. 56).

Fig. 56: **A)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdEC, CAZ y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE. **B)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdEC, CTX y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE. **C)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdEC, CFO y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE.

• **Análisis de la actividad antibacteriana de MdTT frente a *K. pneumoniae* (BLEE+).**

Se probó el extracto MdTT frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE, solo y en combinación con los antibióticos de testeo.

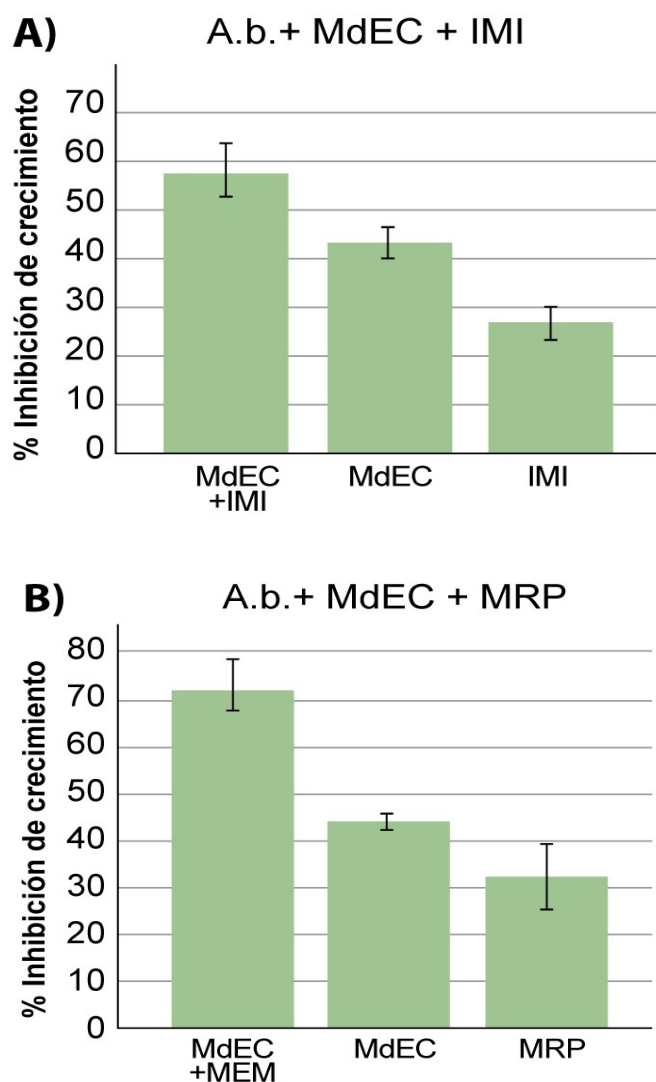


El extracto de MdTT produce inhibiciones parciales cercanas al 50% sobre la cepa de *K. pneumoniae* a las concentraciones elegidas, por lo que confirmamos su **actividad inhibitoria intrínseca**. Al probarse los antibióticos (CAZ, CTX o CFO), observamos nuevamente porcentajes de inhibición de los dentro del el rango del 25 al 35 %. Finalmente, los porcentajes de inhibición se encuentran en el rango del 55 al 65 % al combinarse MdTT con los antibióticos de screening (CAZ, CTX, CFO), por lo que podemos afirmar no se observa sinergismo para la inhibición de mecanismos de resistencia, ya que ninguna combinación supera al menos el 80 % de inhibición (Fig. 57).

Fig. 57 A) Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdTT, CAZ y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE. **B)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdTT, CTX y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE. **C)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdTT, CFO y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE.

• **Análisis de la actividad antibacteriana de MdEC frente a *A. baumannii* (Carbapenemasas +).**

Se probó el extracto MdEC frente a una cepa de *A. baumannii* productora de BLEE, solo y en combinación con los antibióticos de testeo.

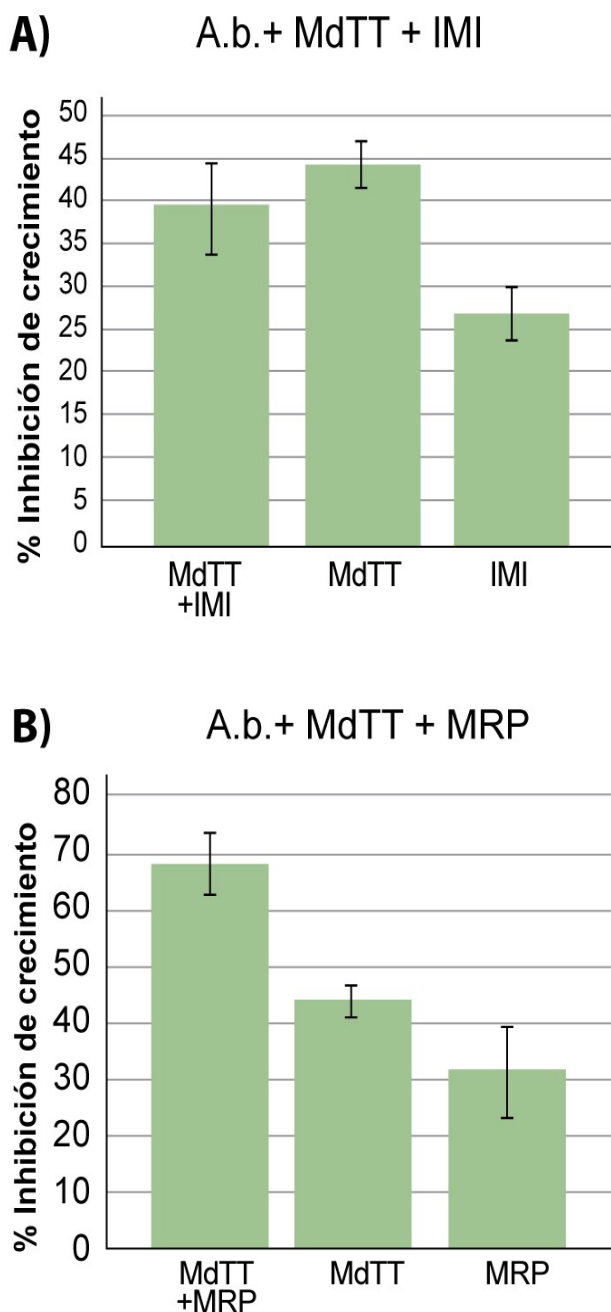


El extracto de MdEC produce inhibiciones parciales de *A. baumannii* cercanas al 45% a las concentraciones elegidas, lo que confirma los resultados en medio sólido, demostrando que MdEC posee **actividad inhibitoria intrínseca** sobre esta bacteria. Al probarse los porcentajes de inhibición de los antibióticos (IMI y MRP), se encuentran en el rango del 25 al 35%. Pero los porcentajes de inhibición de la combinación de MdEC y los antibióticos llegan apenas al rango de 57 al 70%, por lo que podemos afirmar que no se observa sinergismo para la inhibición de mecanismos de resistencia (Fig. 58).

Fig. 58 A) Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdEC, IMI y ambos combinados, frente a una cepa de *A. baumannii* productora de BLEE. **B)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdEC, MRP y ambos combinados, frente a una cepa de *A. baumannii* productora de carbapenemasas.

• **Análisis de la actividad antibacteriana de MdTT frente a *A. baumannii* (Carbapenemasas +).**

Se probó el extracto MdTT frente a una cepa de *A. baumannii* productora de BLEE, solo y en combinación con los antibióticos de testeo.

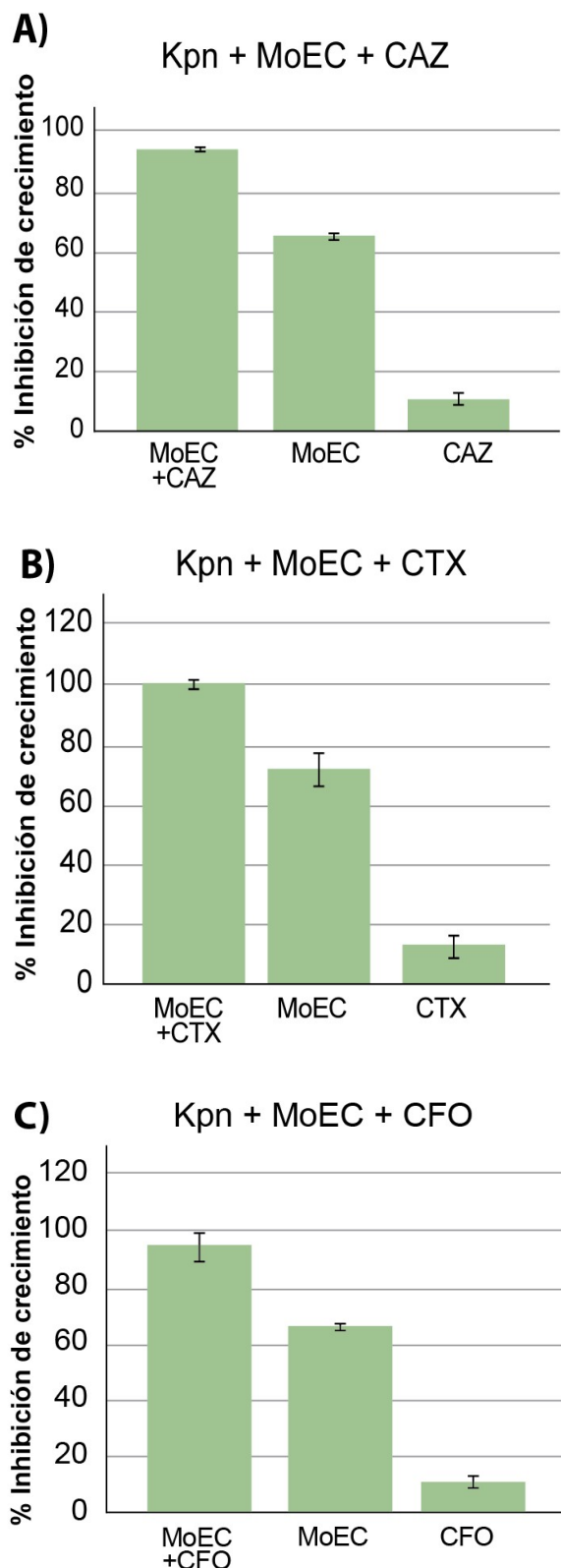


Nuevamente, el extracto de MdTT produce inhibiciones parciales cercanas al 44% de *A. baumannii* a las concentraciones elegidas, verificando su **actividad inhibitoria intrínseca**. Al probarse los porcentajes de inhibición de los antibióticos (IMI y MRP), se observan que se encuentran en el rango del 25 al 35%. Por último, podemos observar que al combinarse MdTT con los antibióticos de screening (IMI y MRP) se visualizan porcentajes de inhibición que van del 38 al 65%, por lo que no se observa sinergismo en la inhibición de mecanismos de resistencia (Fig. 59).

Fig. 59. A) Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdTT, IMI y ambos combinados, frente a una cepa de *A. baumannii* productora de BLEE. **B)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MdTT, MRP y ambos combinados, frente a una cepa de *A. baumannii* productora de carbapenemasas.

- **Testeo de las actividades inhibitorias de los extractos de *Moringa oleífera*.**
- **Análisis de la actividad antibacteriana de MoEC frente a *K. pneumoniae* (BLEE+)**

Se probó el extracto MoEC frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE, solo y en combinación con los antibióticos de testeo.

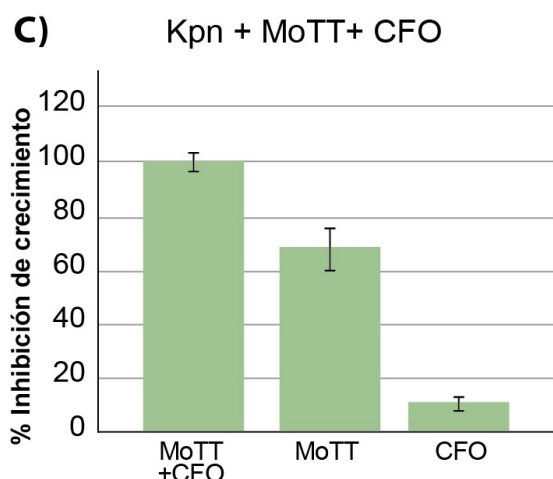
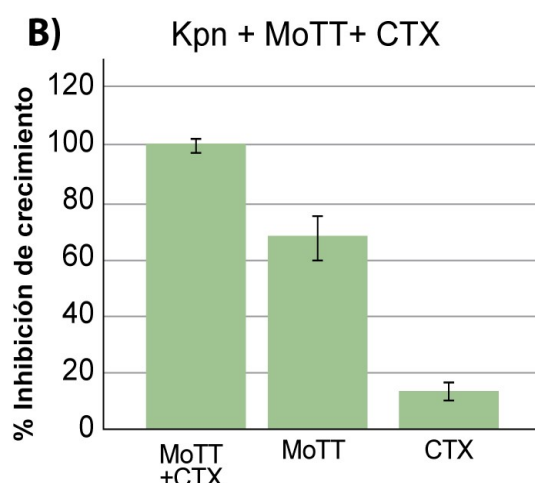
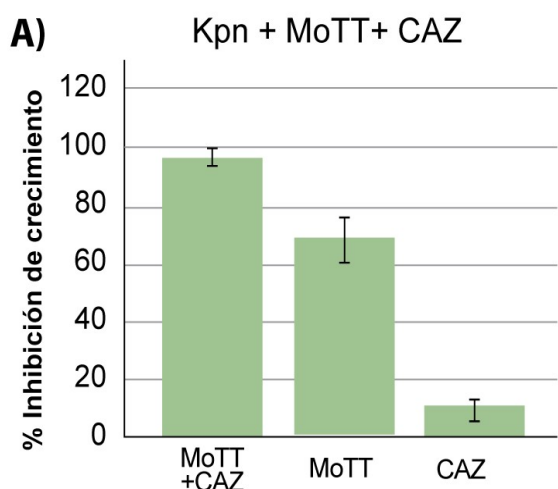


Se observa una inhibición del 63% debida al extracto MoEC sobre la cepa de *K. pneumoniae*, demostrando su **actividad inhibitoria intrínseca**. Los porcentajes de inhibición de los antibióticos (CAZ, CTX o CFO), en el rango del 15-20% de inhibición. Adicionalmente se observa un porcentaje de inhibición del 90% al combinar los antibióticos con el extracto MoEC (lo que es mayor al 78% esperable de la sumatoria de ambos por separado). De esta manera podemos confirmar que la combinación de **MoEC con los antibióticos manifiesta un sinergismo** sobre estos mecanismos de resistencia inducible (Fig. 60).

Fig. 60 A) Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoEC, CAZ y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE. **B)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoEC, CTX y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE. **C)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoEC, CFO y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE.

• **Análisis de la actividad antibacteriana de MoTT frente a *K. pneumoniae* (BLEE+).**

Se probó el extracto MoTT frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE, solo y en combinación con los antibióticos de testeo.

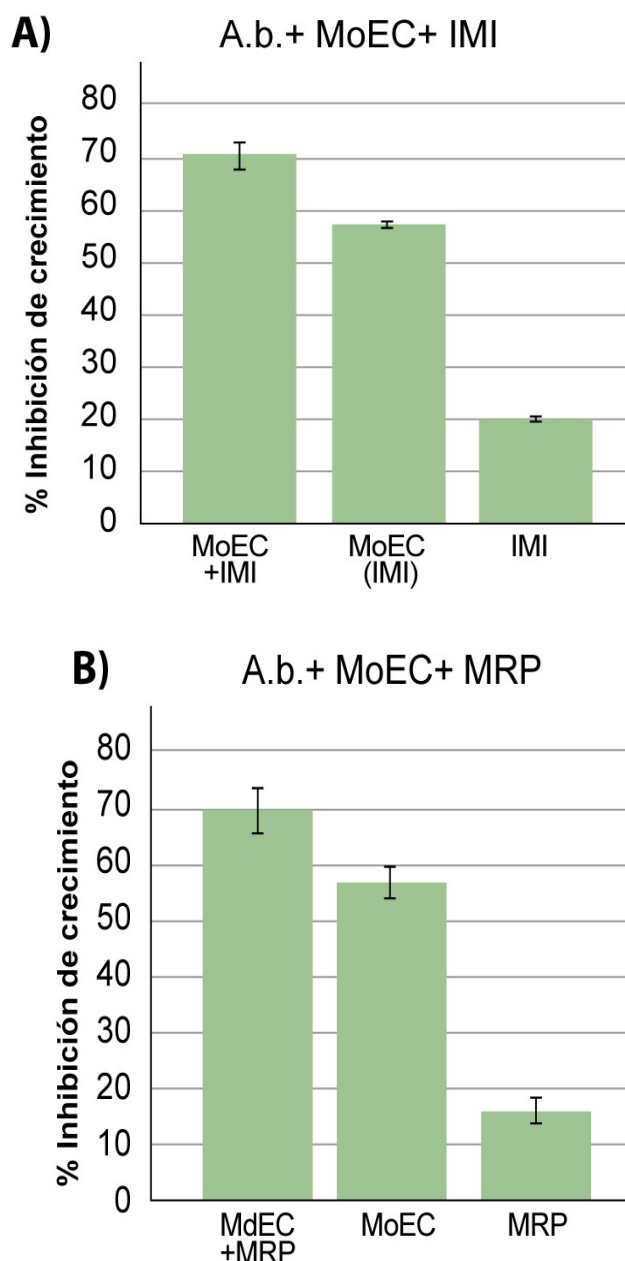


Al observar los resultados se puede calcular una inhibición del 60% debida al extracto MoTT sobre la cepa de *K. pneumoniae*. Los porcentajes de inhibición de los antibióticos (CAZ, CTX o CFO), se encuentran en el rango 15 al 20% de inhibición. Esto nos permitió observar que la combinación de MoTT con los antibióticos, producen un porcentaje de inhibición del 95% (lo que es mayor al 75-80 % esperable de la sumatoria de ambos por separado). De esta comparación numérica, se logró evidenciar completamente dos resultados concluyentes. El primero es que el extracto de MoTT posee **actividad inhibitoria intrínseca** sobre la cepa *K. pneumoniae* productora de BLEE. El segundo es que la combinación de **MoTT con los antibióticos ejerce un mecanismo de sinergismo** sobre estos mecanismos de resistencia inducible (Fig. 61).

Fig. 61: **A)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoTT, CAZ y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE. **B)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoTT, CTX y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE. **C)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoTT, CFO y ambos combinados, frente a una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE.

• **Actividad antibacteriana de MoEC frente a *A. baumannii* (Carbapenemasas +).**

Se probó el extracto MoEC frente a una cepa de *A. baumannii* productora de BLEE, solo y en combinación con los antibióticos de testeo.

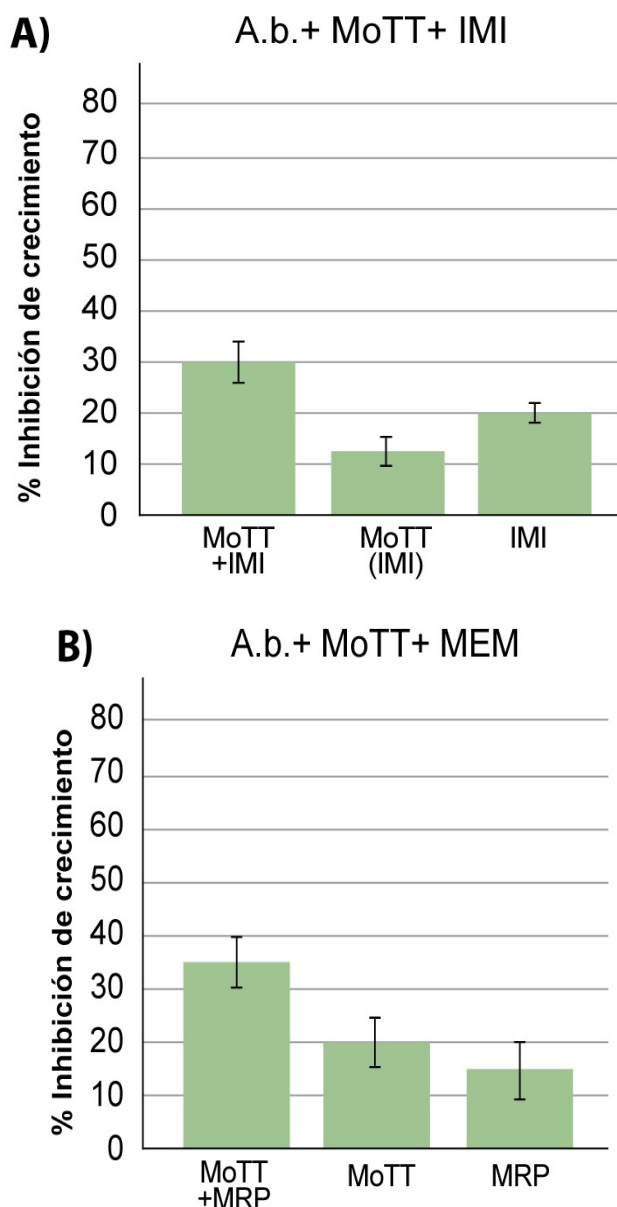


Se observa que MoEC tiene una **interesante actividad antibacteriana intrínseca** contra *A. baumannii* cercana al 50%. La inhibición producida por los antibióticos es alrededor del 15- 20%. La inhibición con la mezcla de MoEC y los antibióticos, alcanza un valor del 70%, lo que demuestra que no hay actividad sinérgica con los antibióticos de testeo, ya que su porcentaje de inhibición iguala a la sumatoria de los porcentajes de inhibición del EPV y del antibiótico por separado (Fig. 62).

Fig. 62: A) Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoEC, IMI y ambos combinados, frente a una cepa de *A. baumannii* productora de BLEE. **B)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoEC, MRP y ambos combinados, frente a una cepa de *A. baumannii* productora de carbapenemasas.

• **Actividad antibacteriana de MoTT frente a *A. baumannii* (Carbapenemasas +)**

Se probó el extracto MoTT frente a una cepa de *A. baumannii* productora de BLEE, solo y en combinación con los antibióticos de testeo.



Se observa que el extracto **MoTT** **tiene actividad intrínseca** contra *A. baumannii*, pero solo alcanza al 12% de inhibición. Es notorio en este caso que la inhibición de los antibióticos también es baja y se encuentra en el rango el 10–15 % de inhibición. La combinación no muestra indicios de sinergismo contra mecanismos de carbapenemasas (Fig. 63).

Fig. 63: A) Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoTT, IMI y ambos combinados, frente a una cepa de *A. baumannii* productora de BLEE. **B)** Sistema donde se evalúa el porcentaje de inhibición que producen MoTT, MRP y ambos combinados, frente a una cepa de *A. baumannii* productora de Carbapenemasas.

- **Importancia del hallazgo de actividad intrínseca y actividad sinérgica**

Los resultados obtenidos en estos ensayos alientan la búsqueda y el estudio de las biomoléculas presentes en los extractos de semillas de morinda y de moringa, cuyas actividades antimicrobianas de bacterias intrahospitalarias resultan prometedoras para potencial uso clínico y farmacéutico.

Resulta importante remarcar el grave problema para la salud humana, que han representado la aparición de mecanismos de resistencia a antibióticos. Ante la formulación de cada nuevo antibiótico, al poco tiempo vemos emerger rápidamente un mecanismo de resistencia nuevo, en alguna cepa bacteriana, y dicha resistencia, que, al ser muchas veces transferida por plásmidos, puede dispersarse a otras especies. Como ya hemos explicado (en el capítulo 1), la historia de los reportes de nuevos mecanismos de resistencia es amplia y permanente. En particular la aparición en 1989 de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que hasta el momento actual se llegan a contar hasta 160 tipos de TEM y 100 tipos de SHV. Las betalactamasas AmpC pueden hidrolizar penicilinas, y otros antibióticos más, pero no son activas frente a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos.

Es de conocimiento general en la comunidad médica, que la mayoría de las unidades de terapia intensiva alrededor del mundo, han sido colonizadas por bacterias multirresistentes capaces de contaminar, por ejemplo, los respiradores mecánicos, infectando a los pocos días a cada paciente que llega a dichas instalaciones, lo que agrava de manera compleja la condición de pacientes que ya llegan con una condición muy grave de base y se le suman infecciones bacteriológicas con bacterias que son muy difíciles de combatir. Es así que, los estudios de vigilancia epidemiológica realizados mundialmente evidencian una importante dispersión de las bacterias productoras de BLEE, carbapenemasas y de otros múltiples mecanismos de resistencia inducibles.

Desde hace varios años, en distintos Hospitales del Partido de La Plata ya han surgido cepas con capacidad productora de BLEE, Meticilino resistencia y cepas con la enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas +), una subclase de las carbapenemasas. Estas cepas con capacidad de soportar niveles terapéuticos de los antibióticos en uso, generan un nuevo desafío para el tratamiento de infecciones bacterianas y fuerzan permanentemente a los profesionales de la salud a desarrollar nuevas conductas a la hora de aplicar un tratamiento y buscar distintas moléculas con capacidad bactericida o bacteriostático.

2.7. Ensayos de inhibición de los extractos sobre el crecimiento de levaduras en medios sólidos.

Se realizaron pruebas de actividad inhibitoria de todos los EPVs sobre *Candida albicans*. Como se ha explicado en la Sec. 1.8.1., en este mismo capítulo, la metodología diseñada no difiere de la utilizada para testear la actividad antibacteriana de los EPVs en medio sólido, siendo las condiciones de trabajo totalmente similares.

Las pruebas de inhibición de *C. albicans*, fueron realizadas en placas de Petri con medio *Müller Hinton* adicionado con glucosa al 5%. Luego de testear los dieciséis (16) EPVs, solo se encontraron resultados preliminares interesantes para los extractos de *Capsicum annuum*. En estos EPVs se pudieron evidenciar halos nítidos de inhibición de 17 mm y de 16 mm para MAEC y para MATT, respectivamente, tal como se muestra en la Fig. 64.

Figura 64. Ensayo de difusión en agar para *Candida albicans*. MATT: Tratamiento térmico de morrón amarillo, MAEC: extracto crudo de morrón amarillo.



A diferencia de los resultados de actividad antibacteriana, en la cual varios EPVs poseían actividad inhibitoria sobre diversas cepas, en el caso de la actividad anti-cándidas solo los extractos de morrón amarillo demostraron dicha actividad. Estos resultados preliminares abren varias perspectivas inéditas sobre el uso de esta especie vegetal como una nueva fuente de un EPV con actividad antifúngica. Como veremos más adelante en el capítulo 5, el análisis, el aislamiento, el estudio y la caracterización de una de las moléculas causante de la actividad anti-cándidas fue motivo de trabajo para un capítulo aparte, debido a los interesantes resultados obtenidos.

Por este motivo es que aquí en el capítulo 2, referido a la caracterización de los EPVs y sus actividades biológicas, solo nombramos el tamizaje inicial de todos los EPVS frente a *Candida albicans*, y en el capítulo 5 nos referiremos a todo el estudio realizado con la muestra de morrón amarillo.

3. Conclusiones de este capítulo

- Los EPVs de chía, chañar, moringa y quinoa son las que poseen mayor porcentaje de proteínas termoestables, mientras que las de morrón amarillo y canola poseen un porcentaje intermedio. Las comparaciones de los resultados obtenidos con los resultados reportados para otros tipos de preparación y obtención de extractos (alcohólicos, por ejemplo), no resultarían válidas ni confiables, porque estaríamos forzando la comparación entre extractos obtenidos por metodologías diferentes.
- Se detectó actividad inhibitoria de tripsina en los EPVs de chañar, morrón amarillo, chía, papa y quinoa. Mientras que los EPVs que mostraron actividad inhibitoria frente a la proteasa papaína fueron los de moringa, canola y quinoa.
- Se halló capacidad antioxidante en varios EPVs, siendo notoria y con una diferencia porcentual en los EPVs de canola y de chañar.
- Las pruebas de capacidad inhibitoria de la actividad de la α -glucosidasa resultaron muy interesantes solo para las muestras de chañar y levemente para las muestras de morrón amarillo.
- En las pruebas de capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano por parte de los EPVs, los únicos que mostraron capacidad inhibitoria muy marcada frente a la mayoría de las cepas ATCC escogidas, fueron los extractos de Moringa. Aunque también se vieron potenciales actividades en los extractos de chía, quinoa y papa.
- Se han encontrado dos resultados de alta relevancia clínica:
 - En primera instancia, el hallazgo de extractos de *Morinda citrifolia* y *Moringa oleifera* con actividad intrínseca sobre bacterias con un mecanismo de resistencia, como es el caso de las *K. pneumoniae* con BLEE y *A. baumannii* con carbapenemasas. Este resultado es muy importante, generando expectativa en cuanto a las posibilidades de aplicación, ya que cada vez contamos con menos opciones terapéuticas para afrontar estas infecciones.
 - En segunda instancia, el hallazgo de sinergismo en la inhibición del mecanismo BLEE de la cepa de *K. pneumoniae*, producida por los extractos de *Moringa oleifera*. Este ensayo fue confirmado por dos métodos diferentes, tanto en medio sólido como en medio líquido. Este descubrimiento implica una potencial aplicación clínica muy valiosa, ya que la utilización de este tipo de sustancias, al utilizarse de manera combinada con EPVs, pueden volver a hacer eficientes el uso de antibióticos combinados contra este tipo de bacterias, en especial a antibióticos que habían quedado obsoletos.
- Los extractos de morrón amarillo, han logrado la inhibición de algunas especies de levaduras del género *Candida*.

Identificación, caracterización y purificación de inhibidores de proteasas provenientes de los EPVs más promisorios

Habiendo encontrado diferentes actividades biológicas (antimicrobiana, antioxidante, anticoagulante, hipoglucemiante) en los extractos vegetales ensayados, se propuso verificar si dichas actividades podrían ser por causa de la participación de inhibidores de proteasas en las mismas. De esta manera, las investigaciones siguientes se focalizarán en la búsqueda, identificación, aislamiento y caracterización de nuevos inhibidores de proteasas, centralizando los objetivos en las actividades biológicas citadas.

El motivo de la búsqueda de inhibidores de proteasas y no de otra molécula de naturaleza proteica, es que nuestro grupo de investigación está preparado y tiene experiencia en la investigación de estas moléculas, pero eso no implica que cualquier otra molécula de naturaleza proteica pueda tener dichas actividades.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los capítulos siguientes serán profundizaciones en los estudios de aquellos EPVs (Moringa, chañar, morrón amarillo) que resultaron interesantes por el hallazgo de diversas actividades biológicas (actividad anticoagulante, antibacteriana, antioxidante, etc.) y, sobre todo, porque en aquellos EPVs, una de las moléculas participantes de dicha actividad fueron inhibidores de proteasas.

CAPÍTULO 3

Purificación y caracterización bioquímica y biológica de un potente y termorresistente inhibidor de papaína de *Moringa oleifera* (MoPI). Potenciales aplicaciones biológicas.

- **Inhibidores de proteasas en semillas.**

Las semillas vegetales contienen nutrientes, como proteínas, aceites y sacáridos (Sonawane, 2018) los cuales las convierten en alimentos predilectos para animales, insectos y microbios. En consecuencia, en el proceso de evolución, las semillas de plantas han desarrollado barreras físicas y compuestos antimicrobianos para protegerse de la destrucción por animales y patógenos (García-Olmedo et al., 1998; Chen et al., 1999). Durante la germinación, sólo los compuestos antimicrobianos son los responsables de la resistencia a las infecciones microbianas, porque las barreras físicas no están disponibles en este punto. Entre varios compuestos, las proteínas antimicrobianas (PAMs), las cuales inhiben el crecimiento de bacterias y hongos patógenos, han sido consideradas muy importantes en la defensa de las plantas (García-Olmedo et al., 1998).

Algunos inhibidores son expresados constitutivamente en semillas y órganos de almacenamiento mientras otros son inducidos por heridas en las plantas. Muchos IPPs también se acumulan en las semillas en desarrollo (García-Olmedo et al., 1995), de manera tal que puedan ser rápidamente liberados durante la germinación. Así, el rol de los IPPs puede estar asociado con la protección de semillas, las cuales carecen de un sistema de defensa activo, y durante la germinación temprana, cuando los tejidos son particularmente expuestos al potencial ataque de patógenos del suelo. Es posible, por lo tanto, que dichos IPPs actúen en conjunto con otras proteínas de defensa expresadas en plantas contribuyendo a restringir la invasión por patógenos (Satheesh & Murugan, 2011).

1. Introducción

1.1. Proteasas cisteínicas e inhibidores:

Las proteasas cisteínicas (PC) se encuentran entre las proteasas más relevantes y de mayor distribución. Están presentes en casi todos los organismos vivos y participan en una variedad de procesos biológicos (Vasiljeva et al., 2007). Se ha informado que el desequilibrio en la actividad de las PC endógenas puede dar lugar a numerosas patologías como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, trastornos neurológicos, tumores y osteoporosis (Berdowska et al., 2000). Las PC producidas por bacterias, virus y los parásitos también se consideran factores importantes en el desarrollo de muchas humanas enfermedades como la paradontosis (Memmert et al., 2017), la malaria, la enfermedad de Chagas y la esquistosomiasis (Rosenthal, 2011; Ndao et al. 2013), entre otros. Mención especial merece el papel de la cisteína proteasa (PCP) similar a la papaína del SARS-CoV-2, que se requiere

para el procesamiento de poliproteínas virales necesarias durante el proceso de propagarse y evadir la inmunidad innata del huésped (Zhang et al., 2020). Desde un punto más general Desde este punto de vista, los PCP desempeñan funciones esenciales en el crecimiento, la diferenciación celular, la señalización y la invasión del huésped en organismos patógenos y, con frecuencia, actúan como un factor de virulencia al atacar al sistema inmunitario del huésped (Sajid et al., 2002; Stoch et al., 2008; Deal, 2009; Zhang et al., 2020). Por lo tanto, el control fino de la actividad proteolítica es esencial para el buen funcionamiento de células enteras y organismos. De hecho, esto se logra en muchos casos, desde la regulación de la expresión, secreción y maduración de proteínas (a través de la escisión específica de la proenzima) al bloqueo de su actividad por inhibición por inhibidores de la proteasa (Hellinger et al., 2019).

Las cistatinas (o fitocistatinas) son una familia de proteínas estructuralmente relacionadas con masas moleculares en el rango de 12 a 23 kDa que funcionan como inhibidores de las PC (Shamsi et al., 2016). Anteriores estudios sugirieron que las fitocistatinas aisladas de maíz, cebada, tomate, arroz, papaya, etc., (Carrillo et al., 2010; Ishimoto et al., 2012; Kruger et al., 2002) puede inhibir las PC de insectos in vitro (Brunelle et al., 2005; Goulet et al. 2008; Schlüter, 2010). Por otro lado, las fitocistatinas aisladas de castaña (*Castanea sativa*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), cebada (*Hordeum vulgare*), malanga (*Colocasia esculenta*), frutilla (*Fragaria vesca*), trigo (*Triticum aestivum*), cacao (*Theobroma cacao*), amaranto (*Amaranthus spp.*) y el sésamo (*Sesamum indicum*) mostraron una fuerte actividad inhibitoria contra patógenos fúngicos de amplio espectro (Lima et al., 2015).

Sin embargo, a pesar de todos estos estudios previos, solo se conoce una cistatina que inhibe específicamente el crecimiento de bacterias. Esta proteína ha sido aislada del kiwi y es capaz de bloquear el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia* y *Erwinia carotovora* (Popovic et al., 2012).

1.2. Propiedades nutricionales y medicinales de la Moringa.

Una de las características más deseables para la mayoría de las aplicaciones biotecnológicas, es disponer de proteínas altamente termoestables ya que las mismas suelen disminuir el impacto ambiental de la actividad industrial (Cavicchioli et al., 2011). Por esto, el descubrimiento de nuevos inhibidores peptídicos de proteasas con estabilidad a temperaturas y pHs extremos resulta de especial utilidad para su aplicación en un amplio rango de procesos biotecnológicos, permitiendo un uso racional de recursos naturales y siendo un requerimiento clave para la explotación comercial (Reed et al., 2013).

Moringa oleifera es una planta originaria de la India que crece en las zonas tropicales y regiones subtropicales del mundo. Por sus altas propiedades nutritivas, toda la planta es normalmente utilizada con fines nutricionales o comerciales. Vale la pena mencionar que diferentes partes de este árbol se aplican como alimento para combatir la desnutrición, especialmente entre los lactantes y la mujer que amamanta en muchos países en desarrollo, incluyendo India, Pakistán, el Filipinas, Hawái y muchas regiones de África (Santos et al., 2015).

Además de su valor nutricional, *M. oleifera* tiene un importante potencial medicinal y farmacológico. En el año 2006 se publica en la revista *Phytotherapy Research* un artículo que señala ciertas propiedades medicinales de la Moringa, entre ellos antihipertensivas, diuréticas, disminución del colesterol, antiespasmódicos, antiulcerosas, hepatoprotectoras y antibacteriales (Anwar et al., 2006).

Estudios recientes han demostrado que los extractos de esta planta poseen fuertes propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antidiabéticas (Gopalakrishnan et al., 2016). Es más, la evidencia sugiere que casi todas las partes de la planta exhiben actividad antibacteriana (Bancesi et al., 2020). En muchos casos, dicha actividad antibacteriana se ha asociado con la presencia de pequeñas sustancias químicas compuestos tales como glucosinolatos (β -tioglucósido N-hidroxisulfatos), isotiocianatos, carbamatos orgánicos, híbridos de chalcona-oxazolidinona y tiocarbamato (Ahmad et al., 2020). Sin embargo, las investigaciones citadas se han centrado en evaluar la actividad de los extractos crudos, pero la identidad y el papel biológico de sus compuestos bioactivos sigue siendo difícil de alcanzar. Por ejemplo, poco se sabe sobre la presencia de inhibidores de proteasa en esta planta.

Los resultados obtenidos en el capítulo 2 para los extractos (EPVs) de moringa pudieron visualizar una clara y potente actividad antimicrobiana, siendo el extracto que resultó más activo contra varias de las cepas ensayadas.

2. Objetivos de este capítulo.

- Purificar parcialmente y caracterizar bioquímicamente el inhibidor de proteasa cisteínico (MoPI), que se evidenció en el capítulo 2.
- Obtener parámetros de inhibición bacteriana para todos los extractos de moringa ensayados (MoEC y MoTT), así como para el inhibidor aislado (MoPI) frente a diversas bacterias patógenas.
- Corroborar si el inhibidor de proteasa cisteínica aislado (MoPI) es en parte, responsable de la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano.
- Corroborar si MoPI posee otras actividades biológicas que puedan ampliar su caracterización, como ser, actividad anticoagulante, hipoglucemiante, y antioxidante.

3. Metodología.

3.1. Preparación de los Extractos.

Como se describió anteriormente en la Sec. 1.1. del Cap. 2., las semillas de moringa (30 g) se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente durante 16-20 h. Se molieron usando una licuadora con la adición de 450 mL de tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4 en un baño de hielo para evitar una posible desnaturalización de las proteínas. Después de incubar durante 2 h temperatura ambiente, la mezcla se filtró con una gasa y el material insoluble se eliminó mediante centrifugación durante 30 min a 7000 $\times$ g a 4 °C. Se recogió el sobrenadante (de ahora en adelante: MoEC) y se congeló inmediatamente a -20 °C. El contenido de proteína total se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976) como describen Cotabarren et al. (Cotabarren et al., 2020a), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (0,1 mg / mL). La actividad inhibidora de la papaína se determinó como se describe en la Sec. 1.3.2. del Cap. 2.

3.2. Purificación parcial por tratamiento térmico.

Como se había nombrado, muchos inhibidores peptídicos de proteasa presentan altos niveles de estabilidad fisicoquímica cuando son sometidos a tratamientos térmicos elevados (alta temperatura, tiempos prolongados), con pérdida mínima de actividad inhibitoria (Cotabarren et al., 2020.b). Algunos de ellos presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuro, característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas (Bártová & Bárta, 2008; Obregón et al., 2012).

De esta manera mediante el proceso de tratamiento térmico, aquellas proteínas termolábiles sufrirán desnaturalización y serán eliminadas en el proceso de centrifugación. Por tal motivo, en este trabajo, al tratamiento térmico se lo considera una primera instancia o paso de purificación. De esta manera, el extracto crudo fue sometido a 100 °C durante 15, 60 y 120 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y las proteínas desnaturalizadas térmicamente se eliminan por centrifugación durante 30 min a 7000 $\times$ g a 4°C.

Finalmente se determinó el contenido total de proteínas y la actividad inhibidora de las muestras tratadas térmicamente. Cada muestra obtenida se denominó MoTT15, MoTT60 y MoTT120, de acuerdo con el tiempo de incubación.

3.3. Cromatografía de afinidad.

Se cargó una muestra de 150 mL de MoTT15 en una columna (1,5 × 12 cm) conteniendo papaína inmovilizada en glioxil-agarosa, conectada a un Äkta-Purifier (Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.) previamente equilibrada con tampón fosfato 0,01 M, pH 6,5, considerado el pH óptimo para la interacción papaína-inhibidor (Obregón et al., 2012). Después de la eliminación completa de las proteínas no retenidas con el buffer de equilibrio, las proteínas de interés se eluyeron generando un cambio repentino de pH mediante la adición de HCl 0,01 M, pH 2,5 a un caudal de 0,7 mL/min. Las fracciones eluidas fueron inmediatamente neutralizadas mediante la adición de NaOH 0,1 M. El inhibidor de papaína purificado se denominó MoPI. (Inhibidor de papaína de *M. oleifera*). La actividad inhibidora de papaína y la cuantificación de proteínas fueron determinadas como se describió anteriormente (sec. 1.3.2. del cap. 2 y sec. 1.2. del cap. 2.). Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE como se describe por Cotabarren y col. (Cotabarren et al., 2015).

3.4. Análisis enzimático de la actividad inhibitoria frente a papaína.

La actividad inhibitoria de papaína se determinó utilizando el sustrato específico L-piroglutamil-L-fenilalanil-L-leucina-p-nitroanilida (PFLNA), tal como se explicó en la metodología del Cap. 2. Sec. 1.3.2., con algunas modificaciones. Se controló la hidrólisis de PFLNA midiendo el aumento de la absorbancia a 410 nm a 37 °C cada minuto durante 10 (Obregón et al., 2012). Los volúmenes de reacción se adaptaron a una placa de 96 pocillos con un volumen final de 200 µL. La inhibición de la actividad de la papaína provocó una disminución en la tasa de hidrólisis del sustrato, lo que resultó en la atenuación de la pendiente de hidrólisis. La actividad inhibitoria fue estimada como la actividad proteolítica residual en presencia del inhibidor y expresada como porcentaje de inhibición en comparación con el ensayo de control (en ausencia del inhibidor). En el caso de las muestras tratadas térmicamente, el volumen utilizado en cada ensayo fue de 20 µL. Una unidad inhibitoria de papaína (1 UIP) se definió como la disminución de 0,01 unidades de absorbancia a 410 nm por ensayo de 10 min, a 37 °C. La constante inhibitoria (K_i) y la IC_{50} (definida como la concentración de inhibidor requerida para disminuir en un 50 % la actividad de la enzima) se calcularon de acuerdo con el protocolo descrito por Tellechea (Tellechea et al., 2016), modificado para inhibición de la papaína. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.4.1. Determinación de la IC₅₀.

Se realizó una curva dosis respuesta. La IC₅₀ fue determinada midiendo la actividad inhibitoria de los diferentes extractos vegetales a distintas concentraciones proteicas, hasta que la actividad enzimática disminuyó completamente. Para ello se normalizaron las pendientes relativas a la pendiente obtenida sin extracto y expresadas en valor porcentual. Luego se utilizó el programa GraphPad para ajustar los datos a la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(X - \log IC_{50})}}$$

Dónde X es el log de la concentración proteica ensayada, e Y es la actividad enzimática normalizada (relativa a la condición control expresada como porcentaje de máxima actividad).

3.4.2. Determinación de la constante cinética de inhibición (K_i).

La constante cinética de inhibición se calculó a partir del gráfico de Dixon (1/v vs [I], donde [I] es la concentración de inhibidor). Los ensayos se realizaron a concentraciones crecientes de muestra y dos concentraciones fijas de sustrato. Luego se expresaron los valores de 1/v vs. [I] y se calculó el valor de K_i a partir de la intersección de las dos curvas. (Dixon, 1953; Cornish-Bowden, 1974).

3.5. Actividad anticoagulante.

Se evaluó la actividad anticoagulante de MoPI mediante ensayos con coagulómetro digital Coatrom M1. Se utilizó como plasma de referencia, un preparado de plasma sanguíneo humano, el cual se fabrica conformando un “pool” a partir de muestras obtenidas de pacientes voluntarios con valores normales en los parámetros hemostáticos. Las muestras sanguíneas fueron colectadas en tubos que contenían una solución de citrato de sodio al 3,8% p/v (anticoagulante), de manera tal de mantener una relación (1:9) en la cual por cada volumen de solución de anticoagulante se agregaron 9 volúmenes de sangre entera. El plasma pobre en plaquetas fue obtenido de la fracción superior del sobrenadante resultante de centrifugar dicho pool a 2500 xg durante 15 min a temperatura ambiente. Las muestras de plasma pobre en plaquetas (ppp) obtenidas, fueron reunidas, divididas en alícuotas y almacenadas a -80°C hasta su uso.

Para evaluar la acción de los inhibidores sobre las vías de la coagulación se empleó como muestra el “pool de ppp” descrito anteriormente. Para ello se incubaron 10 µl de diferentes concentraciones de la muestra del inhibidor desalado o buffer (blanco) con 100 µl del ppp durante 2 minutos a 37 °C. Inmediatamente se midió el tiempo de coagulación mediante el uso de kits comerciales siguiendo las indicaciones del fabricante (Wiener Lab). Los ensayos de incubación del ppp con el EPV se repitieron al menos 3 veces y los valores de los tiempos de coagulación se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar.

3.5.1. Tiempo de protrombina (TP).

Esta prueba permite evaluar el funcionamiento de la vía extrínseca de la coagulación y consiste en medir el tiempo de coagulación de un plasma descalcificado en presencia de tromboplastina tisular y Ca^{+2} . Para ello, 25 µl de la mezcla ppp con el inhibidor o buffer se incubaron con 50 µl del reactivo comercial Soluplastin (Wiener Lab.), que contiene tromboplastina tisular y Ca^{+2} , pre incubados previamente a 37 °C. Se midió el tiempo hasta la aparición del coágulo (TP).

3.5.2. Tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT).

Esta prueba permite evaluar el funcionamiento de la vía intrínseca de la coagulación y consiste en medir el tiempo de coagulación del plasma descalcificado en presencia de un exceso de tromboplastina parcial, una superficie cargada negativamente y Ca^{+2} . Se incubaron 25 µl de la mezcla ppp con el inhibidor y se incubaron con 25 µl del reactivo A (cefalina y ácido ellágico, Wiener Lab.), durante 3 minutos a 37 °C. Luego se agregó el reactivo B (Ca^{+2}) y se midió el tiempo hasta la aparición del coágulo (aPTT).

3.6. Actividad Antibacteriana.

Para determinar la capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de diversas cepas bacterianas por parte del inhibidor, se realizó el ensayo de difusión en agar basado en la prueba de Kirby-Bauer con ligeras modificaciones (Bauer et al., 1966). Inicialmente, los preinóculos de diferentes microorganismos patógenos (*Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*) se cultivaron a 37 °C durante 18–24 h y se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana con una solución fisiológica a escala de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Los inóculos se sembraron en placas de agar Müller Hinton, en las que se colocó una gota de 10 µL de inhibidor. Una vez

seca la gota colocada en la placa, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Luego, se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (en milímetros). Los ensayos se realizaron por triplicado, incluyendo los respectivos controles. (Revisar Sec. 1.8.1. Cap. 2).

3.7. Determinación de la actividad antioxidante.

3.7.1. Método de ABTS.

Ver metodología Cap. 2. Sec. 1.3.

3.7.2. Método de DPPH.

Se basa en la captura del radical 2,2-difenil-1-picrylhidrazyl (DPPH) por los compuestos antioxidantes, produciendo un descenso de la absorbancia a 517 nm. Las pruebas se llevarán a cabo por triplicado y se calculará el valor IC₅₀ que representa la concentración del EPV que causa el 50% de neutralización del radical (Stef et al., 2009).

La técnica se realizará mezclando concentraciones crecientes de EPVs con 50 µL de DPPH 0.2 mM disuelto en 150 µL de metanol (Brand Williams et al., 1995). La absorbancia máxima de DPPH será medida reemplazando el volumen de EPV por el equivalente de agua. Luego de 20 minutos de incubación a 37 °C en oscuridad, se leerá la absorbancia a 517 nm y se calculará el porcentaje de actividad antioxidante correspondiente.

$$(\%) \text{ Actividad en Eliminación de Radicales DPPH} = 100 \times \left(\frac{A1 - A2}{A1} \right)$$

Donde A1 es la absorbancia del control sin muestra y A2 es la absorbancia en presencia de muestra y DPPH.

3.8. Actividad inhibitoria de la enzima α-glucosidasa.

Se realizó este experimento según lo descrito en el Cap. 2 Sec. 1.4.

3.9. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos (ANOVA) se realizaron con GraphPad Prism (v6.03, GraphPad Software Inc. San Diego, CA, EE. UU., 2012). Las diferencias significativas entre las medias de los parámetros se determinaron mediante la prueba post-hoc de Tukey (p < 0,05).

4. Resultados y discusiones.

4.1. Aislamiento y purificación de MoPI.

Se sabe que las semillas de moringa son fuentes ricas en lípidos (31%) y su eliminación conduce a un expeller alto en proteínas (19%), generando un producto interesante para la nutrición humana. Como se describe en la Secc. 1.1. del cap. 2., preparamos un extracto crudo de semillas de *M. oleifera* (MoEC). La concentración de proteína de la muestra fue de $3,51 \pm 0,03$ mg / mL ver Tabla 7 que está en acuerdo con informes anteriores (Abreu-Payrol et al., 2017). Respecto a la actividad inhibitoria de MoEC, se observó que inhibe fuertemente la papaína con un valor de IC_{50} de $0.025 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Tabla 7: Concentración de las muestras de Extractos Crudos y los diferentes Tratamientos Térmicos de *M. oleifera*.

Muestra	Contenido Proteico Total (mg/mL) ^a
Extracto Crudo de <i>M. oleifera</i>	3.51 ± 0.03
Extracto Crudo de <i>M. oleifera</i> luego de un tratamiento a 100°C por 15 minutos (MoTT15)	1.73 ± 0.05
Extracto Crudo de <i>M. oleifera</i> luego de un tratamiento a 100°C por 60 minutos (MoTT60)	1.66 ± 0.06
Extracto Crudo de <i>M. oleifera</i> luego de un tratamiento a 100°C por 120 minutos (MoTT120)	1.30 ± 0.04

Concentración proteica del extracto crudo de *M. oleifera*, y de tres extractos tratados térmicamente a 100°C por diferentes periodos de tiempo (15, 60 y 120 min). ^a

Los valores son la desviación estándar media (n=3).

Como se mencionó anteriormente, se han purificado varios inhibidores de proteasas vegetales y se ha encontrado que son estables y activos a altas temperaturas (Cotabarren et al., 2020^a; Prathibha et al., 1995). Por esta razón, se incubó al MoEC a 100°C durante 15, 60 y 120 min como paso inicial de purificación. Como se observa en la Tabla 1, el tratamiento a 100°C produjo una disminución en el contenido de proteínas de 50-60% con respecto al extracto crudo. A continuación, se determinó la actividad inhibitoria de papaína en las muestras correspondiente a cada tratamiento térmico (MoTT15, MoTT60 y MoTT120).

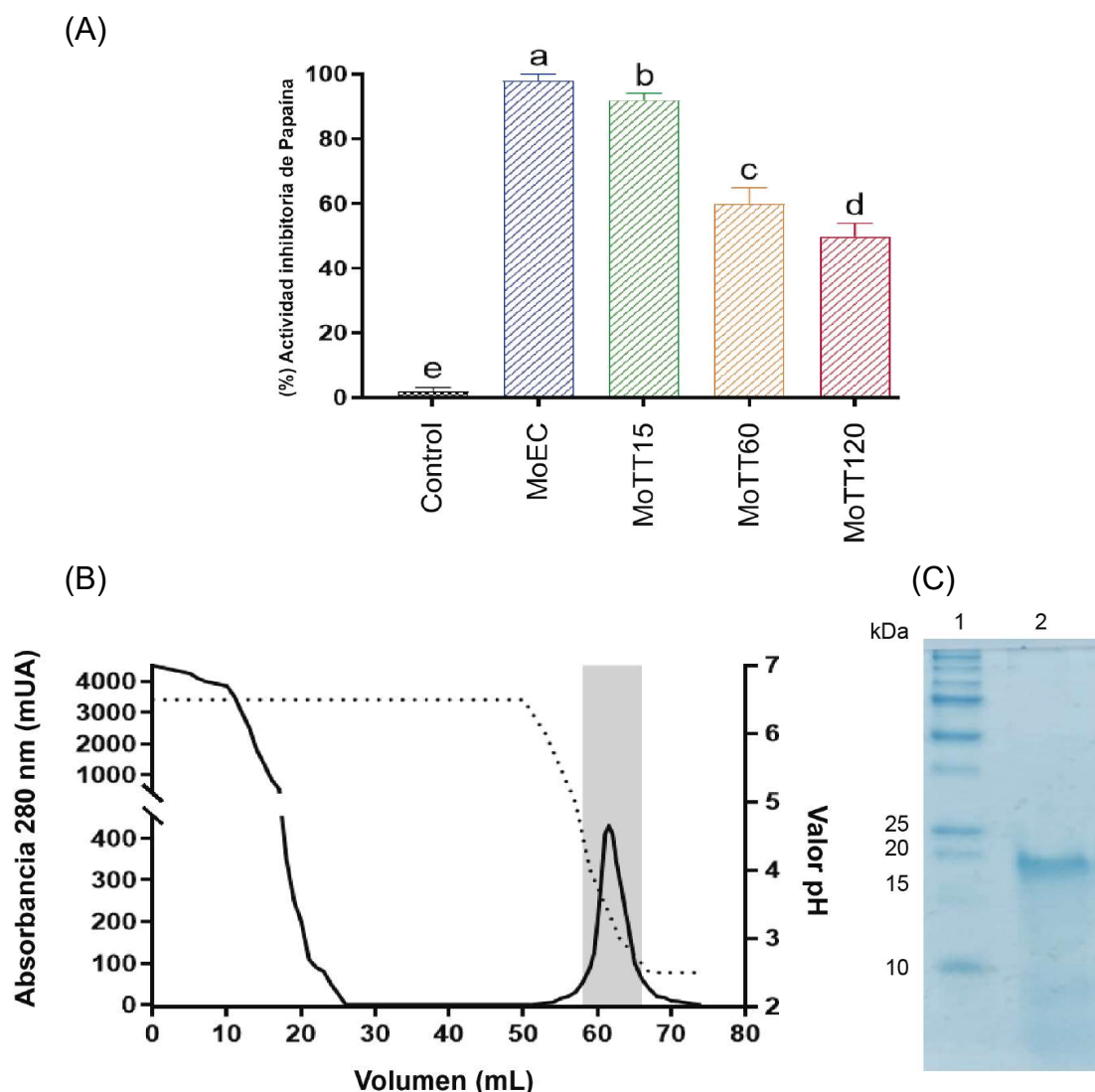


Figura 65. Aislamiento y purificación del inhibidor de Papaína (MoPI) de *M. oleifera*, desde extracto crudo (MoEC). **(A)** % de actividad inhibitoria de Papaína en presencia de diferentes muestras tratadas térmicamente de *M. oleifera*. MoEC: Extracto Crudo de *M. oleifera*, MoTT15-120: Extracto Crudo de *M. oleifera* luego de un tratamiento a 100 °C por 15, 60 y 120 min. * $p < 0.05$, comparado con el control; ^a $p < 0.05$ comparado con MoEC; ^b $p < 0.05$ comparado con MoTT15; ^c $p < 0.05$ comparado con MoTT60 (one-way ANOVA y test de comparación múltiple de Turkey). **(B)** Purificación de un inhibidor de Papaína de *M. oleifera* por cromatografía de afinidad con Papaína inmovilizada. Las fracciones con actividad inhibitoria (zona gris) fueron recolectadas y nombradas MoPI. **(C)** Electroforesis (SDS-PAGE, 21%V/V) del inhibidor de Papaína de *M. oleifera* (MoPI). Calle 1: Marcador de baja masa molecular.; Calle 2: Inhibidor de Papaína de *M. oleifera* purificado.

Como se muestra en la Figura 70, la actividad inhibitoria contra papaína se mantuvo incluso después de 120 min. de incubación, sugiriendo una extraordinaria termoestabilidad del inhibidor. Vale la pena mencionar que esta propiedad es muy interesante para muchas aplicaciones biotecnológicas, detrás de un valor añadido para su explotación comercial (Pandhare et al., 2002).

Además de la estabilidad térmica, también evaluamos el efecto de temperatura sobre la estabilidad del inhibidor a dos valores de pH extremos (pH 2 y 9). Asombrosamente, después de 60 min de incubación, pudimos recuperar el 100% de la actividad inhibidora contra papaína. Esta estabilidad fisicoquímica inusual es una característica notable de las fitocistatinas. Hasta ahora, solo hay un informe anterior que describe un inhibidor de papaína aislado de Semillas de *Vigna unguiculata* que presentaban tanto estabilidad térmica como tolerancia similar en una amplia gama de pH (Júnior et al., 2017).

4.2. Purificación de un inhibidor de papaína de moringa (MoPI) mediante cromatografía de afinidad.

Como se muestra en la Tabla 8. y en la Figura 70, MoTT15 es la muestra con una mejor relación entre conservación de la actividad/eliminación de proteínas solubles no inhibitorias. Es más, este tratamiento térmico representa un paso de purificación simple y crucial para lograr una purificación del inhibidor.

MoPI se purificó a partir de MoTT15 después de realizar un paso de centrifugación de alta velocidad. Después de la centrifugación, el sobrenadante que contenía el inhibidor se purificó por cromatografía de afinidad utilizando un soporte especial a base de glioxil-agarosa que contiene papaína covalentemente inmovilizada. Luego, se determinó la actividad inhibidora de papaína de las fracciones eluidas. Como se muestra en la Figura 70.B, el inhibidor purificado eluyó como un solo pico que contenía una concentración de proteína de $0,16 \pm 0,01$ mg/mL y actividad inhibidora específica sobre papaína de 10,81 UIP/mg (Tabla 8).

Tabla 8. Caracterización de los productos generados en los diferentes pasos de purificación de los extractos de *M. oleífera*.

PASO DE PURIFICACIÓN	Cantidad de Proteína total (mg)	Actividad total inhibitoria (UIP) ^a	Actividad inhibitoria específica (UIP/mg)	Grado de Purificación	Rendimiento (%)
Extracto Crudo	564,6 $\pm$ 4.8	42,5 $\pm$ 6.7	0,07 $\pm$ 0.01	1,0	100
Tratamiento térmico a 100°C	259,5 $\pm$ 7.5	39,8 $\pm$ 4.3	0,15 $\pm$ 0.01	2,1	93,7
Cromatografía de afinidad	1,3 $\pm$ 0.1	14,1 $\pm$ 2.4	10,81 $\pm$ 1.31	154,4	33,2

^a Una Unidad Inhibitoria de Papaína (1 UIP) fue definida como la cantidad del inhibidor que genera un decrecimiento del 0.1 en la absorbancia a 410 nm bajo las condiciones del ensayo. ^b El grado de purificación fue calculado como la relación entre la actividad inhibitoria específica determinada después de cada paso de purificación, respecto de la actividad inhibitoria específica inicial presente en el extracto crudo. ^c El rendimiento fue calculado como la actividad inhibitoria después de cada paso de purificación respecto de la del extracto crudo (%).

Después las diferentes etapas de purificación, MoPI presentó un peso molecular aparente de 19 kDa (Figura 70. C). Este tamaño está de acuerdo con el tamaño de otras fitocistatinas previamente aisladas de plantas, es decir, fitocistatina de ajo (Siddiqui et al., 2017), inhibidor de la proteasa de cebada y Inhibidor de la cisteína del frijol caupí, *Vigna unguiculata* (Júnior et al., 2017).

4.3. Cinética de inhibición.

Los estudios cinéticos de la actividad de inhibición de MoPI se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Tellechea et al (Tellechea et al., 2016). El análisis de los datos reveló que MoPI tiene un valor de IC_{50} de 0.11 $\mu\text{g/mL}$ (5.7×10^{-9} M, Fig. 66. A) y un valor de K_i de 2.1×10^{-9} M (Fig. 66. B).

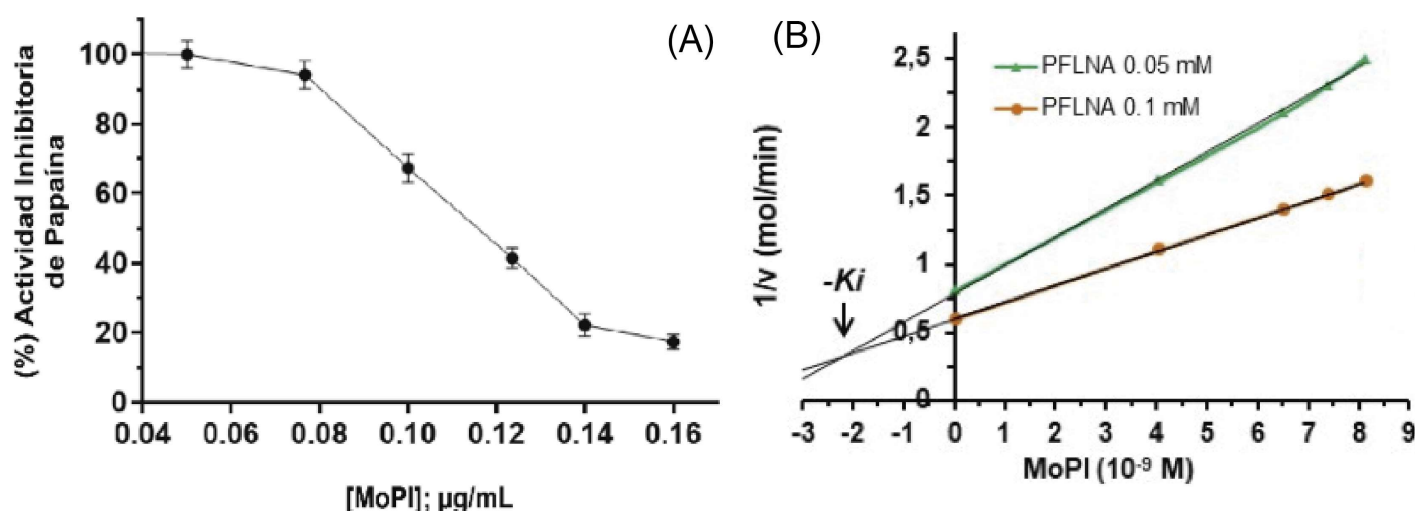


Figura 66: Estudios cinéticos sobre el inhibidor de papaína de *M. oleifera*. (A) Curva de dosis-respuesta para la determinación de IC_{50} . (B) Gráfico de Dixon ($1/v$ vs $[I]$) para la identificación del parámetro K_i . Cada punto representa la media de tres estimaciones.

En comparación con otros inhibidores de proteasa termoestables reportados previamente en la literatura (Cotabarren et al., 2020a), MoPI presenta uno de los valores de IC_{50} más bajos (Tabla 9), mostrando una potente actividad inhibitoria de papaína, ya que requiere concentraciones bajas para producir una alta inhibición de la misma. En comparación con otros fuertes inhibidores de proteasas termoestables encontrados en la literatura (Cotabarren et al., 2020a), MoPI presenta mayor capacidad inhibidora que el inhibidor de tripsina de *Jatropha curcas* ($IC_{50} = 1,25 \times 10^{-6}$ M); (Costa et al., 2014), inhibidor de tripsina de *Erythrina velutina* ($IC_{50} = 2,2 \times 10^{-6}$ M); (Machado et al., 2013), e inhibidor de tripsina de *Sapindus saponaria* ($IC_{50} = 8,3 \times 10^{-8}$ M); (Macedo et al., 2011).

Tabla 9. Termoestabilidad de las fitocistatinas aisladas en los últimos 20 años.

Inhibidor	Nombre de la planta	Origen	Ki (M)	IC ₅₀	PM (kDa)	T (°C)	t min.	AIR	Ref.
GPC	<i>Allium sativum</i>	Bulbo	8.5 x 10 ⁻⁸	N/D	12.5	90	90	10	A
VuCys1	<i>Vigna unguiculatam</i>	Recombinante (hojas)	N/D	N/D	10.7 (1)	100	60	100	B
VuCys2			N/D	N/D	21.9 (2)	100	60	90	
YMP	<i>Brassica alba</i>	Semillas	3.1 x 10 ⁻⁷	9.0 x 10 ⁻⁷	26.4	90	30	10	C
Almond cystatin	<i>Prunus dulcis</i>	Frutos	4.54 x 10 ⁻⁸	N/D	63.4	90	30	15	D
Mustard TPI	<i>Brassica juncea</i>	Semillas	1.0 x 10 ⁻⁷	N/D	18.1	90	30	25	E
SBPC	<i>Gicine max</i>	Haba	3.59 x 10 ⁻⁶	N/D	19	90	30	15	F
PMC I	<i>Phaseolus mungo</i>	Semillas	N/D	N/D	19.1 (1)	80	30	80	G
PMC II			N/D	N/D	17.5 (2)	90	30	55	
CICPI	<i>Cassia leiandra</i>	Semillas	4.1 x 10 ⁻⁷	8.5 x 10 ⁻⁷	18.3	100	30	90	H
MoPI	<i>Moringa oleifera</i>	Semillas	2.1 x 10 ⁻⁹	5.7 x 10 ⁻⁹	19	100	20 15 60	60	I

Abreviaturas: Ki: Constante de inhibición; IC₅₀: Cantidad de inhibidor necesaria para producir una inhibición de la papaína del 50%. PM: Peso Molecular; T: temperatura; t: Tiempo de incubación; AIR: Actividad Inhibitoria Residual; Ref.: Referencia (A) Siddiqui et al., 2017; (B) Júnior et al., 2017; (C) Shamsi et al, 2017; (D) Siddiqui et al, 2016; (E) Khan et al., 2016; (F) Siddiqui et al., 2019; (G) Rashid et al, 2006; (H) Melo 2019). (I) Cotabarren et al., 2021.

MoPI también presenta una constante inhibitoria (Ki) significativamente baja en comparación con otros IP termoestables, tales como el inhibidor de la proteinasa de papaya (Ki = 3x10⁻⁷ M; (Azarkan et al., 2006), el inhibidor de proteinasa de *Cajanus cajan* (2,72x10⁻⁷ M), (Swathi, 2014), el inhibidor de proteasa de *Albizia amara* (1.24x10⁻⁸ M), (Dabhade et al., 2016) y el inhibidor de proteasa del ajo (*Allium sativum*) (8.5x10⁻⁸ M), (Siddiqui et al., 2017), siendo la primera fitocistatina termoestable aislada hasta la fecha con tal potencia inhibitoria. Por otro lado, luego de una extensa búsqueda bibliográfica, se pudo observar que mientras la mayoría de las fitocistatinas mantienen solo un 10-25% de su capacidad inhibitoria luego de una incubación de 80-90°C, MoPI conserva la capacidad inhibitoria total luego de 15 min de incubación a 100°C, dato que afianza ser una de las fitocistatinas más estables reportadas a la fecha. Solo VuCys1 (Júnior et al., 2017) presenta termoestabilidad luego de 60 min de incubación a 100°C, sin embargo, no se reportó la cinética inhibitoria de este inhibidor, por lo que no es posible comparar la capacidad inhibitoria de VuCys1 con la observada para MoPI. Es importante notar que, aunque las fitocistatinas incluidas en la Tabla 9 fueron clasificadas por sus autores como IP altamente termoestables, informamos en un artículo publicado

recientemente (Cotabarren et al., 2020.a) que tales fitocistatinas no se encuentran dentro del super inhibidores estables. Por este motivo, los datos actuales de estabilidad, IC₅₀ y Ki posicionan a MoPI como una de las fitocistatinas con mayor progresión, interés e impacto por su uso biotecnológico, por encima de otras fitocistatinas estudiadas hasta la fecha.

Una de las aplicaciones biotecnológicas más prometedoras de los IPPs es su inclusión en el desarrollo de cultivos transgénicos. Para ello se realizaron varios estudios dirigidos a caracterizar la dependencia de la estabilidad térmica de los IPPs respecto al pH, y se establecieron las condiciones óptimas para la aplicación de estas proteínas en biotecnología, tanto la involucrada en el desarrollo de dichos cultivos resistentes a las plagas de insectos (Lanzotti, 2006) como en la industria farmacéutica como inhibidores específicos de patógenos como hongos y bacterias (Ryan, 1990).

4.4 Actividad anticoagulante.

No se han encontrado publicaciones anteriores a lo presentado en este trabajo respecto de fitocistatinas con actividad anticoagulante. Recientemente se publicó una nueva fitocistatina denominada CsCPI1, de la planta del té (*Camellia sinensis*) que promueve la actividad antitrombótica (Fang et al., 2023), sin embargo, en comparación con MoPI, CsCPI1 solo conserva un 50% de su actividad inhibitoria cuando es incubado a 100 °C durante 5 minutos.

Tabla 10. Tabla comparativa de los tiempos de coagulación entre un ppp control y uno tratado con MoPI

MUESTRA	Tiempo en la prueba de Protrombina (seg) ^a	Tiempo en la prueba de aPTT (seg) ^a
Control	18,6 ± 0,7	44,4 ± 3,1
MoPI	18,1 ± 0,7	60,6 ± 0,9 *

^a Los valores tienen una media ± de desviación estándar (n=3). **p* < 0.05, comparado con el control (prueba de dos-colas también llamada bilateral).

4.5. Actividad antimicrobiana.

Tal como se demostró en el capítulo de caracterización de EPVs (Cap. 2), la actividad antimicrobiana del extracto crudo (MoEC) y la muestra tratada térmicamente (MoTT) fueron las más interesantes para continuar con el estudio y caracterización de las moléculas responsables de dicha actividad. En este sentido, se verificó si el potente inhibidor de papaína de *M. oleifera* es una de las moléculas responsables de inhibir el crecimiento bacteriano. Como

se observa en la Tabla 11., los resultados confirman los hallazgos preliminares de Bancessi y colegas (Bancessi et al., 2020), que informaron actividad antimicrobiana de los extractos de hojas y semillas de Moringa. En este caso se encontró actividad antibacteriana usando MoEC en dosis de 175 µg contra *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. cloacae*, *Proteus vulgaris*, *K. pneumoniae*. Más interesante aún, la muestra tratada térmicamente, MoTT (85 µg), mostró un fuerte efecto de inhibición contra el crecimiento de *E. faecalis* y *S. aureus*, al igual que MoPI en dosis de 24 µg (Tabla 11).

Con los nuevos resultados obtenidos, se puede afirmar que MoPI presenta un perfil similar de inhibición que el observado para el MoTT15, lo que sugiere que MoPI tendría una fuerte propiedad antibacteriana contra *E. faecalis* y *S. aureus*. Cabe señalar que las pruebas fueron realizadas utilizando una concentración de muestra de MoPI relativamente baja. Evaluación de la actividad antibacterial del Extracto Crudo de *M oleifera* (MoEC), del Extracto con Tratamiento Térmico (MoTT) y el inhibidor purificado MoPI.

Tabla 11. Resultados de las pruebas de sensibilidad de MoEC, MoTT y MOPI, ante un grupo ampliado de bacterias.

BACTERIA	MoEC (175µg)	MoTT (85µg)	MoPI (24µg)
<i>Citrobacter amalonaticus</i> CIPROVE	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> CIPROVE	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	++	++	++
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC700603	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> CIPROVE	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> CIPROVE	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	+++	+++	+

ATCC: American Type Culture Collection; CIPROVE: cultivos de la colección del CIPROVE, Facultad de Cs Exacta, Universidad de La Plata. Zonas de Inhibición (+++): zonas de inhibición mayores a 7mm; (++) : zonas de inhibición mayores a 6mm; (+): zonas de inhibición mayores a 5mm; (-): no se observa inhibición del desarrollo.

Como se mencionó anteriormente, la única fitocistatina conocida con actividad antibacteriana es una cistatina de kiwi que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium*

tumefaciens, *Burkholderia cepacia* y *Erwinia carotovora* (Popovic et al., 2012). El estudio de esta tesis representa una nueva evidencia del papel antimicrobiano de las fitocistatinas, ampliando sus posibles aplicaciones biomédicas.

Hasta el momento no hay evidencia de que las cisteín proteasas (ausentes en el sistema intestinal humano) tengan algún papel importante, en comparación con las serin proteasas, en la degradación de los alimentos humanos. Por lo tanto, las cistatinas vegetales tendrían características apropiadas para ser utilizadas como productos farmacéuticos y/o para ser incorporadas como nutracéuticos debido a sus propiedades antimicrobianas y antivirales, ya que solo pueden interactuar con cisteína proteasas microbianas o virales en el intestino humano (Atkinson et al., 2004). Además, mediante técnicas de Biología Molecular, se podrían generar cistatinas modificadas que podrían actuar como potentes agentes nutracéuticos para el desarrollo de un producto alimenticio diseñado a partir de plantas modificadas genéticamente que permita prevenir la infección de patógenos en el sistema digestivo humano (Cotabarren et al., 2019). Se sabe que, con el objetivo de hacer llegar las propiedades de la Moringa al consumidor, se están realizando estudios con diferentes alimentos, principalmente productos cárnicos y panes, en los que se incorpora la Moringa (hoja, semilla, extractos, etc.) como ingrediente. En productos cárnicos se utiliza como conservante y aditivo antioxidante con muy buenos resultados sin afectar las características sensoriales del producto final. En el sector de la panadería, el objetivo suele ser el enriquecimiento nutricional de los alimentos. Sería muy interesante incorporar extractos de semillas de Moringa como aditivo alimentario, sustituyendo a diferentes conservantes y antioxidantes químicos, y al mismo tiempo su uso en la elaboración de productos básicos de alto valor nutritivo, ideales para determinados grupos de población con mayor riesgo de desnutrición. Hay indicios de que la industria se está preparando para una gran inversión en "alimentos de diseño" con beneficios para los humanos. Dichos alimentos, que en última instancia podrían disminuir la demanda de medicamentos, también podrían ayudar a controlar enfermedades y trastornos a menudo asociados con un cambio en el estilo de vida.

4.6. Actividad antioxidante.

No se han encontrado resultados alentadores para las muestras de MoPI en las concentraciones a las que se ha conseguido producir este inhibidor.

4.7. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

No se han encontrado resultados positivos para las muestras de MoPI a las concentraciones investigadas.

5. Conclusiones de este capítulo.

En este capítulo, se estudió el aislamiento y la purificación del primer inhibidor de papaína de semillas de *M. oleifera*, con elevada estabilidad térmica y al pH, mostrando una sorprendente actividad inhibitoria contra papaína con valores de K_i e IC_{50} en el rango nanomolar, lo que convierte a este inhibidor en una de las fitocistatinas más poderosas encontradas hasta la fecha. Por otra parte, MoPI presenta un fuerte efecto antimicrobiano frente a cepas de *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* y posee actividad anticoagulante contra la vía intrínseca de la cascada de la coagulación.

En conjunto, estas propiedades posicionan a esta nueva molécula como un potencial agente antibacteriano natural adecuado para aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas. Esta investigación también contribuye al conocimiento de características inéditas en este tipo de inhibidores, siendo el primer inhibidor de cisteína proteasa de origen vegetal con esta particular combinación de actividades biológicas (actividad antibacteriana y anticoagulante).

Resumen de conclusiones específicas:

- Se preparó un extracto crudo de semillas de *M. oleifera* (MoEC) cuya concentración de proteína fue de $3,51 \pm 0,03$ mg / mL. MoEC inhibe fuertemente la proteasa papaína con un valor de IC_{50} de 0.025 μ g/mL.
- El inhibidor MoPI presente en MoEC y en MoTT mantiene su actividad inhibitoria a temperaturas (100 °C, 120 min) y pHs extremos (2 y 9).
- Luego de la purificación MoPI presentó una concentración de proteína de $0,16 \pm 0,01$ mg/mL y un peso molecular aparente de 19 kDa estimado por SDS-PAGE.
- MoPI presentó actividad inhibitoria específica sobre papaína de $10,81$ UIP/mg., un valor de IC_{50} de $0,11$ μ g/mL (5.7×10^{-9} M) y un valor de K_i de $2,1 \times 10^{-9}$ M. En comparación con otros inhibidores de proteasa termoestables reportados previamente en la literatura MoPI presenta uno de los valores de IC_{50} más bajos.
- MoPI presentó, a la concentración evaluada ($12,5$ μ g/mL), un incremento del 25 % en el tiempo de tromboplastina parcial activada, respecto de la muestra control al ser ensayada la vía intrínseca. Este resultado sugiere una potencial aplicación del inhibidor de papaína

de *M. oleifera* como agente anticoagulante de origen natural como alternativa a los agentes anticoagulantes convencionales.

- Respecto al comportamiento de MoPI para la vía extrínseca los valores obtenidos no dan indicios de actividad inhibitoria.
- MoPI presenta inhibición del crecimiento bacteriano, contra las cepas *E. faecalis* y *S. aureus*.

CAPÍTULO 4

Purificación y caracterización bioquímica y biológica de un potente y termorresistente inhibidor de tripsina de *Geoffroea decorticans* (GdTI). Potencial aplicación como anticoagulante e hipoglucemiante.

1. Introducción

1.1. Resumen de las propiedades nutricionales y medicinales del chañar.

Las propiedades medicinales de la fruta del chañar han sido comprobadas científicamente como un antitusivo, expectorante, analgésico y antiinflamatorio (Quiroga et al., 2009; Costamagna et al., 2016; Reynoso et al., 2013; Jiménez-Aspee et al., 2017), siendo esta última afectada por el calor cuando se consume en su forma cocida (arropo).

1.2. Proteasas serínicas e inhibidores de proteasas serínicas.

Las proteasas serínicas son hidrolasas que degradan enlaces peptídicos de péptidos y proteínas y poseen en su sitio activo un aminoácido serina esencial para la catálisis enzimática. Esta clase de enzimas incluye a la tripsina, quimotripsina, subtilisina, granzima y otras. En animales, se encuentran en páncreas e intestino, y son activas de pH neutros a alcalinos; inactivándose o volviéndose inestables a pH ácido (Lizarazo Rodríguez, 2008)

Este tipo de proteasas cortan la cadena polipeptídica en el extremo carboxilo (C-terminal) de aminoácidos específicos (Arg y Lys), y dicha escisión se lleva a cabo en medio de la cadena peptídica y no en sus residuos terminales (Olsen et al., 2004), formando parte del grupo de endopeptidasas. Por ejemplo, la tripsina corta en el extremo carboxilo de los residuos básicos como la lisina o la arginina, mientras que la quimotripsina lo hace junto a residuos hidrófobos, como la fenilalanina.

La tripsina es la más estudiada de este grupo de proteasas ya que es primordial para el proceso digestivo de muchos animales. Se secreta en el páncreas, posee un peso molecular de 22 a 24 kDa y presenta actividad a pH entre 7.5 a 10 y temperaturas óptimas entre 35-45°C, siendo su pH y temperatura óptima 8 y 37°C respectivamente (Janssen et al., 2004).

El residuo de aspartato (Asp 189) localizado en la región catalítica de las tripsinas atrae y estabiliza lisinas y argininas (ambas cargadas positivamente), y por ello es responsable de la especificidad de la enzima.

- **Inhibidores de serín proteasas.**

La mayoría de los IPPs de origen vegetal son inhibidores de serín proteasas (Fan & Wu, 2005). En general, sus pesos moleculares van desde los 4–20 kDa, muchos de ellos son hidrofóbicos, catiónicos y con un alto contenido de residuos de cisteína. Estos residuos forman puentes disulfuro intra o intercatenarios, generando una estructura compacta y estable. Varios estudios llevados a cabo en los últimos años han demostrado que la alta estabilidad fisicoquímica de los IPPs es usualmente consecuencia de su estructura (Torres-Castillo et al., 2009; Souza et al., 2014; Cotabarren et al., 2018; Martins et al., 2018; Cotabarren et al., 2020).

- **Inhibidores de tripsina.**

Los inhibidores de tripsina, luego de una extensa búsqueda bibliográfica, parecerían encontrarse sólo en leguminosas. En presencia de una proteasa y un sustrato producen una notoria disminución en la velocidad de la reacción catalizada por la primera. En la soja, siendo la familia de inhibidores más estudiada y caracterizada, se encuentran diferentes tipos; de los cuales se destacan el de Kunitz y Bowman-Birk, que constituyen aproximadamente un 15% de las proteínas de la semilla. Sin embargo, este significativo porcentaje de inhibidores de proteasas, hace que se los considere como antinutrientes por impedir la proteólisis digestiva de la soja (Quicazán & Caicedo, 2012).

2. Objetivos de este capítulo

Los extractos de *Geoffroea decorticans* (chañar) presentaron muy buena actividad inhibitoria de tripsina. El objetivo principal de este capítulo será la búsqueda de un inhibidor de proteasa que mantenga dicha actividad y su caracterización y purificación parcial. Aunque el contenido nutricional de las semillas de chañar y el aislamiento de varios compuestos fenólicos ya han sido descritos, ninguna molécula de origen proteico de esta muestra vegetal ha sido reportada hasta la fecha.

- Purificar parcialmente y caracterizar bioquímicamente al inhibidor de proteasa serínica (GdTI) que se observó en el capítulo 2.
- Corroborar si GdTI es en parte, responsable de las actividades antioxidantes encontradas en el capítulo 2.
- Corroborar si el inhibidor posee otra actividad biológica que puedan ampliar su caracterización, como ser, actividad anticoagulante y actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

3. Metodología.

3.1. Material Vegetal y Obtención del EC

Se realizó según la metodología descrita en la Sec. 1.1. Cap. 2.

3.2. Determinación del contenido proteico

Acorde a la metodología descrita en la Sec. 1.2. Cap. 2.

3.3. Ensayos cinéticos de inhibición de tripsina

La actividad inhibitoria de la tripsina se determinó utilizando el sustrato N- α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) según Erlanger, Kokowsky & Cohen (Erlanger et al., 1961) con ligeras modificaciones y adaptado a una placa de 96 pocillos. Se preincubó una cantidad fija de tripsina (0,25 mg/mL) con diferentes concentraciones del extracto (que oscilaron entre 0 y 50 μ g/mL) en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5) que contenía CaCl₂ 50 mM. Después de 10 min de preincubación a 37 °C, se añadió el sustrato a cada mezcla de reacción a una concentración final de 1 mM. La hidrólisis de BAPNA se registró mediante el aumento de la absorbancia a 410 nm a 37 °C cada minuto durante 10 min. Una unidad inhibitoria de tripsina (1 UIT) se definió como la disminución de 0,01 unidades de absorbancia a 410 nm por ensayo de 10 min, a 37 °C. Las mediciones se realizaron por triplicado y también se incluyeron blancos apropiados. (Sec. 1.3.1. Cap. 2).

3.4. Purificación parcial por tratamiento térmico.

El extracto crudo (GdEC) se sometió a un amplio rango de temperaturas (40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C y 100 °C) en baño maría durante 30 min. Después de enfriar a temperatura ambiente, las proteínas desnaturalizadas térmicamente se eliminaron mediante centrifugación durante 30 min a 7000 $\times$ g y 4 °C. Posteriormente, se determinó el contenido de proteína total y la actividad inhibitoria del extracto crudo no tratado y las muestras tratadas térmicamente. Cada muestra obtenida se denominó GdTT40, GdTT50, GdTT60, GdTT70, GdTT80, GdTT90 y GdTT100, de acuerdo con la temperatura de incubación utilizada. (Sec. 3.2. del Cap. 3).

3.5. Cromatografía de exclusión molecular.

Se cargó una alícuota de 2 mL de GdHT90 (80 μ g/mL) en una columna Sephacryl-S100 HR (1,5 $\times$ 40 cm) conectada a un purificador Äkta (GE Healthcare) previamente equilibrado con buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5). La elución se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0,8

mL/min, controlando la absorbancia a 280 nm, y se evaluó la actividad inhibitoria de tripsina en las fracciones, como se describió anteriormente.

3.6. Cromatografía de afinidad a tripsina.

La muestra a ser purificada por cromatografía de afinidad a tripsina se sembró en una columna cromatográfica conteniendo tripsina inmovilizada (1,5 x 12 cm) en soportes de glioxil-agarosa. La columna fue previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y luego fue conectada al equipo Äkta-Purifier (GE Healthcare). Las fracciones proteicas no retenidas fueron eluidas con el mismo buffer a un flujo de 0,7 ml/min y midiendo la absorbancia a 215 nm, 280 nm y 330 nm hasta llegar a cero. A continuación, la fracción retenida fue eluída generando un descenso progresivo del pH, cambiando el buffer de elución por HCl 0,01 M para lograr la desestabilización del complejo tripsina-inhibidor. Las fracciones eluidas con pH menor a 7, fueron neutralizadas por agregado de gotas de NaOH 3 M. Para conservar la columna, la misma fue lavada con Tris-HCl 0,1 M pH 8, luego con H₂O destilada estéril y, por último, con etanol 20%.

A cada una de las fracciones eluidas que mostraron un pico de absorbancia, se les determinó la concentración de proteínas mediante el método de Lowry y la actividad inhibitoria de tripsina (Sec. 1.2. del Cap. 2.). Se empleó la técnica de liofilización para concentrar las fracciones proteicas.

3.7. Análisis por electroforesis.

Descrito en el Cap. 1 Sec. 1.5. GdEC y GdTT (GdTT40-GdTT100) fueron analizados por SDS-PAGE para determinar la pureza del inhibidor de proteasa durante los diferentes pasos de purificación.

3.8. Determinación por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS.

Los análisis de Espectrometría de Masas se realizaron en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM, en la Universidad de Buenos Aires-CONICET, de la siguiente manera: la muestra se mezcló con un volumen igual de solución matriz de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico). Previamente, la muestra fue desalada por diálisis en filtros de 0,022 µm. La mezcla de matriz y muestra a analizar se colocó sobre una placa MTP 384 de acero pulido TF de Bruker Daltonics y las gotas se evaporaron hasta sequedad a temperatura ambiente. Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas

Bruker Daltonics Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EE. UU.) que funciona en un modo lineal positivo.

La identificación de péptidos se logró mediante digestión triptica y posterior análisis por nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masas con tecnología Orbitrap. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) utilizando la base de datos Fabaceae. Los péptidos identificados se alinearon con el software BLASTP.

3.9. Efecto del pH y de la temperatura.

Para el ensayo de estabilidad térmica, se incubaron alícuotas de GdTI a 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C y 100 °C durante 1 h y luego se enfriaron a temperatura ambiente. También se determinó la estabilidad de la temperatura para una temperatura fija (90 °C y 100 °C) durante 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 y 5 h. En ambos casos, la actividad inhibitoria de tripsina residual de GdTI se determinó usando BApNA como sustrato, como se describió previamente en la Sec. 2.7.1. El efecto del pH sobre la estabilidad de GdTI se evaluó midiendo la actividad residual después de la incubación a varios valores de pH (pH 2, pH 4, pH 6, pH 8, pH 10 y pH 12) durante 1 h a 25 °C. La actividad inhibidora de tripsina residual de GdTI se determinó como se describió previamente en la Sec. 1.3.1. Cap. 2., usando BApNA como sustrato.

3.10. Cálculo de IC_{50} y estudios cinéticos.

La cantidad de GdTI necesaria para una inhibición del 50 % de la actividad de la tripsina se determinó usando diferentes concentraciones del inhibidor. Para calcular la constante de inhibición (K_i) de GdTI, se utilizó el gráfico de Dixon ($1/v$ frente a $[I]$, donde $[I]$ es la concentración de inhibidor). Los ensayos se realizaron utilizando concentraciones crecientes de GdTI (0–3,2 $\mu\text{g/mL}$) y BApNA (1,0 y 2,0 mM) para la cinética de inhibición de la tripsina. La tripsina bovina se utilizó a una concentración fija de 0,25 mg/mL y las reacciones se realizaron como se describió anteriormente. En la Sec. 3.4.1. Cap. 3. y Sec. 3.4.2. Cap. 3. El recíproco de la velocidad de reacción de la enzima se expresó como $1/v$, y el valor de K_i se calculó a partir de la intersección de las dos líneas trazadas para dos concentraciones diferentes de BApNA en el gráfico de Dixon.

3.11. Actividad anticoagulante.

Se aplicó la metodología descrita en el Sec. 3.5. Cap. 3.

En este caso se incubaron inicialmente partes iguales de la muestra de ppp y GdTI en el rango de 0-180 $\mu\text{g/mL}$, durante 2 min a 37 °C.

Para todos los ensayos, las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y se lograron los controles apropiados.

3.12. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

Se siguió la metodología descrita en el Cap. 2 Sec. 1.4. En este caso, se realizó una curva dosis respuesta a partir de la cual se determinó el parámetro cinético IC_{50} . Con la finalidad de averiguar este valor para el inhibidor purificado GdTI, se normalizaron las pendientes relativas a la pendiente obtenida sin agregado de muestra y expresadas en porcentaje. Luego se utilizó el programa GraphPad para ajustar los datos a la siguiente ecuación:

X corresponde al logaritmo de la concentración proteica ensayada e Y a la actividad de GdTI normalizada (relativa a la condición control expresada como porcentaje de máxima actividad).

Para ello, se preincubó una cantidad fija de α -glucosidasa (0,2 U/mL) con diferentes concentraciones de GdTI (que oscilaron entre 0 y 2,24 $\mu\text{g/mL}$) en buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8). Después de 15 min de preincubación a 37 °C, se añadió el sustrato a cada mezcla de reacción a una concentración final de 0,2 mM. La hidrólisis de pNPG se registró mediante el aumento de la absorbancia a 405 nm a 37 °C cada minuto durante 20 min. Las mediciones se realizaron por triplicado y también se incluyeron blancos apropiados. Las medidas se realizaron por triplicado y se incluyeron los blancos apropiados correspondientes a H₂O destilada estéril y, además, se incluyó un control de concentración de sales (control NaCl 25 mM), con el objetivo de probar que la inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa por parte del GdTI se debía exclusivamente a la presencia del inhibidor en la muestra y no a las sales presentes en la misma.

3.13. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos (ANOVA) se realizaron con GraphPad Prismv. 01 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Las diferencias significativas entre las medias de los parámetros se determinaron mediante la prueba a-posteriori de Tukey (p= 0,05).

3.13. Determinación de la actividad antioxidante.

Se determinó la actividad antioxidante para GdTI mediante las técnicas de ABTS y DPPH. La técnica de ABTS, fue descrita en el Cap. 2. Sec. 1.3. y la técnica de DPPH se realizará tal como se describe en el Cap.3 Sec. 3.7.2.

4. Resultados y discusiones.

Caracterización de un nuevo inhibidor de tripsina obtenido de semillas de *G. decorticans*.

4.1. Aislamiento y purificación de un inhibidor de tripsina de semillas de chañar.

Con la premisa de ampliar los resultados obtenidos preliminarmente en el capítulo de EPVs, se decidió obtener nuevos extractos crudos y tratamientos térmicos para ampliar los estudios de caracterización de GdEC y GdTT para posteriormente continuar con la caracterización y purificación de su inhibidor de proteasa serínica.

De acuerdo a la metodología detallada en la Sec. 1.2. Cap. 2. y Sec. 1.3.1. Cap. 2., se obtuvo nuevamente un extracto crudo (GdEC) con un contenido proteico total de $171,2 \pm 8,7$ $\mu\text{g/mL}$ y actividad inhibitoria de tripsina de $21,35 \pm 3,25$ UIT, donde una unidad inhibitoria de tripsina se definió como la disminución en 0,01 unidades de absorbancia a 410nm en 10 min de ensayo, empleando BApNA como sustrato a 37 ° C y a pH 8.

4.2. Purificación parcial por tratamiento térmico.

Como se nombró anteriormente, los IPPs son biomoléculas que presentan gran estabilidad fisicoquímica con mínima pérdida de actividad inhibitoria (Cotabarren et al., 2020; Torres-Castillo et al., 2009; Souza et al., 2014; Cotabarren et al., 2018; Martins et al., 2018; Qi et al., 2005).

Por tal motivo, se realizaron varios ensayos planteando diferentes tratamientos térmicos de GdEC, como paso inicial de purificación. Para ello, se evaluó la actividad inhibitoria residual de tripsina luego de someter a GdEC a 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 °C por 30 min., con la posterior eliminación de las proteínas desnaturalizadas mediante centrifugación (Sec. 3.2. Cap. 3.). Como se observa en la Tabla 12, mediante esta estrategia de purificación parcial fue posible reducir el contenido proteico total en las fracciones tratadas térmicamente sin pérdida significativa de la actividad inhibitoria de tripsina.

Así, fue posible observar una IC_{50} de $0,66 \pm 0,17$ $\mu\text{g/mL}$ para el tratamiento térmico a 90 ° C y una IC_{50} de $0,55 \pm 0,18$ $\mu\text{g/mL}$ para el tratamiento térmico a 100°C. Concentraciones y valores IC_{50} para GdEC, GdTT40-100.

Tabla 12. Concentración proteica en ($\mu\text{g/mL}$) y valor de IC_{50} para los extractos de Chañar.

Muestra	Concentración proteica ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
GdEC	$171,2 \pm 8,7$	$4,28 \pm 0,21$
GdTT40	$85,8 \pm 6,3$	$2,15 \pm 0,15$
GdTT50	$51,2 \pm 3,5$	$1,28 \pm 0,18$
GdTT60	$47,1 \pm 4,7$	$1,17 \pm 0,23$
GdTT70	$44,2 \pm 1,2$	$1,11 \pm 0,15$
GdTT80	$45,3 \pm 5,2$	$1,13 \pm 0,13$
GdTT90	$26,2 \pm 9,6$	$0,66 \pm 0,17$
GdTT100	$22,3 \pm 7,4$	$0,55 \pm 0,18$

GdEC: Extracto crudo de *G. decorticans*, GdTT40-100: Extracto con tratamiento térmico de *G. decorticans* luego de tratamiento térmico a 40-100 °C por 30 min.

Se pudo evidenciar de esta manera una reducción general en el valor de las IC_{50} en función del aumento de temperatura, lo cual es consistente con una purificación parcial del inhibidor de tripsina de chañar.

Con el fin de evaluar la distribución proteica en los diferentes tratamientos térmicos, se realizó un ensayo de SDS-PAGE. En la Figura 73. se puede observar una progresiva disminución en las bandas correspondientes a proteínas de alto peso molecular. Se observó una disminución en las fracciones proteicas con pesos moleculares mayores a 30 kDa (fracción a) (Figura 68.) como función del aumento de temperatura, lo cual puede indicar la eliminación de proteínas termolábiles. Además, se observó que 4 fracciones proteicas de aproximadamente 30 kDa, 20 kDa, 15 kDa y menos de 10 kDa fracciones (b), (c), (d), y (e) respectivamente (Figura 68) no fueron afectadas por el aumento de temperatura, lo que confirma la presencia de proteínas o péptidos termoestables.

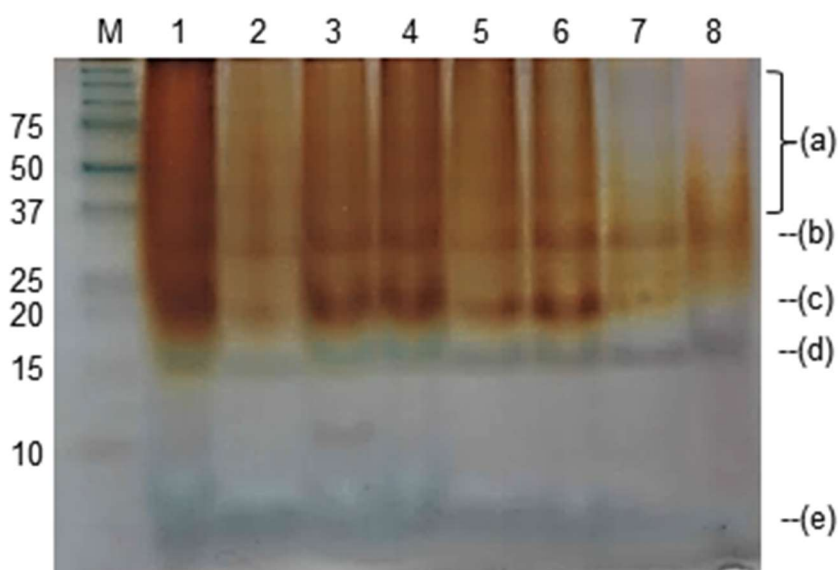


Figura 68. Electroforesis (SDS-PAGE, 12% v/v) teñidas con plata, de las fracciones proteicas obtenidas luego de la purificación parcial por tratamiento térmico. M, marcador de peso molecular; **1**, extracto crudo (GdEC); **2**, tratamiento térmico a 40 °C durante 30 min (GdTT40); **3**, GdEC tratamiento térmico a 50 °C durante 30 min (GdTT50); **4**, GdEC tratamiento térmico a 60 °C durante 30 min (GdTT60); **5**, GdEC tratamiento térmico a 70 °C durante 30 min (GdTT70); **6**, GdEC tratamiento térmico a 80 °C durante 30 min (GdTT80); **7**, GdEC tratamiento térmico a 90 °C durante 30 min (GdTT90); **8**, GdEC tratamiento térmico a 100 °C durante 30 min (GdTT100). Fracciones (a), (b), (c), (d) y (e) indican las fracciones proteicas de aproximadamente 30 kDa, 20 kDa, 15 kDa y menos que 10 kDa, respectivamente.

Considerando que el tratamiento térmico luego de 30 min de incubación a 90 °C constituye un método simple y efectivo para la remoción de proteínas termolábiles, fue seleccionado como una muestra inicial para ser sembrada en la columna de cromatografía de exclusión molecular. Si bien el tratamiento térmico a 100 °C asegura la eliminación eficiente de proteínas, el valor de IC_{50} obtenido indica que no hay diferencias significativas entre ambos tratamientos (Tabla 12). Por esa razón, el tratamiento térmico a 90 °C fue seleccionado para continuar los pasos de purificación considerando que la muestra es sometida a menor estrés térmico y que, además, representa un paso de purificación con menor gasto operativo en caso de un futuro escalado a nivel industrial.

4.3. Purificación por cromatografía de exclusión molecular y de afinidad.

El segundo paso para la purificación del inhibidor fue someter a GdTT90 a una cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephacryl S-100 HR (Sec. 3.1. Cap. 3.). Se midió la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas y se determinó la actividad inhibitoria de tripsina en cada una de ellas (Figura 74 A). Luego, las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular que presentaron actividad inhibitoria de tripsina fueron cargadas en una columna con tripsina inmovilizada en glioxil agarosa (Sec. 3.6. Cap. 4).

Luego de la elución de las proteínas no retenidas, se aplicó un gradiente de pH ácido que eluyó el inhibidor de tripsina, llamado GdTI (Fig. 69 B).

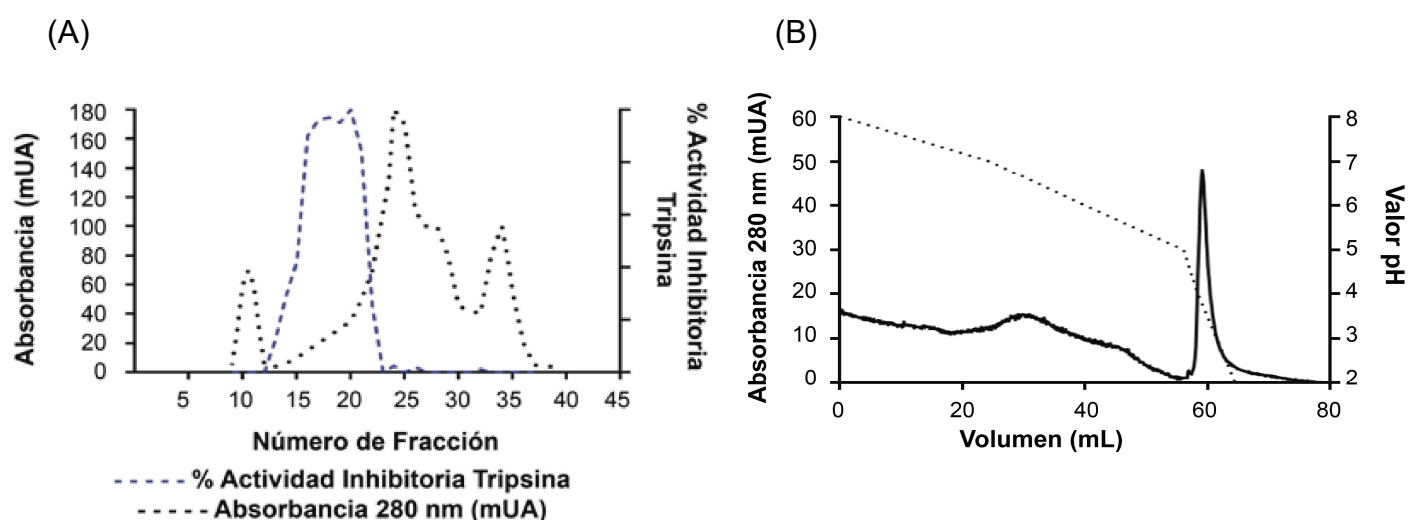


Figura 69. Purificación del inhibidor de tripsina de *Geoffroea decorticans*. (A) Cromatografía de exclusión molecular para GdTT90. (B) Cromatografía de afinidad a tripsina para las fracciones de exclusión molecular con actividad inhibitoria.

Bajo las condiciones de trabajo seleccionadas, la purificación parcial por tratamiento térmico a 90 ° C por 30 min fue efectiva para la remoción de las proteínas de alto peso molecular, observando que la actividad inhibitoria de tripsina específica aumentó 2,53 veces respecto al extracto crudo (Tabla 13.). Los siguientes pasos de purificación (cromatografía de exclusión molecular y de afinidad) mostraron una actividad inhibitoria específica de $18,74 \pm 1,15$ UIT/mg de proteína y $75,98 \pm 4,77$ UIT/mg proteína respectivamente, con un rendimiento final de 39,8% respecto al material de partida.

Tabla 13. Caracterización de los etapas de purificación de los

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(X - \log IC_{50})}}$$

diferentes productos de las extractos de *G. decorticans*.

Paso de purificación	Cant. total proteína (mg)	Act. inhibitoria total (UIT) ^a	Act. inhibitoria específica (UIT/mg)	Pureza ^b	Rendimiento (%) ^c
Extracto crudo	3,59 ± 0,27	21,35 ± 3,25	5,94 ± 0,46	1	100
Tratamiento térmico a 90 °C	1,2 ± 0,13	18,02 ± 2,47	15,02 ± 0,43	2,53	84,4
Cromatografía de exclusión molecular	0,72 ± 0,08	13,49 ± 0,68	18,74 ± 1,15	3,15	63,2
Cromatografía de afinidad	0,11 ± 0,01	8,51 ± 0,23	75,98 ± 4,77	12,79	39,86

^a Una unidad Inhibitoria de tripsina (1 UIT) se define como la disminución en 0,01 unidades de absorbancia a 410 nm en 10 min de ensayo, a 37 °C. ^b El índice de purificación fue calculado como la relación entre la actividad inhibitoria específica en cada paso de la purificación y el la del extracto crudo tomada como 1. ^c El rendimiento fue calculado en base a la actividad inhibitoria total recuperada.

4.4. Caracterización del inhibidor de tripsina de *G. decorticans* (GdTI).

• Cinética de inhibición.

Los estudios cinéticos de inhibición de tripsina para GdTI mostraron que la cantidad de inhibidor necesaria para el 50% de inhibición de tripsina (IC₅₀) fue de 0,22 μM (Figura 70 A), mientras que la Ki (calculada por el método gráfico de Dixon) fue de 2,1 nM (Figura 70 B), indicando que la actividad inhibitoria de tripsina ocurre a muy bajas concentraciones de GdTI, caracterizando un inhibidor muy potente.

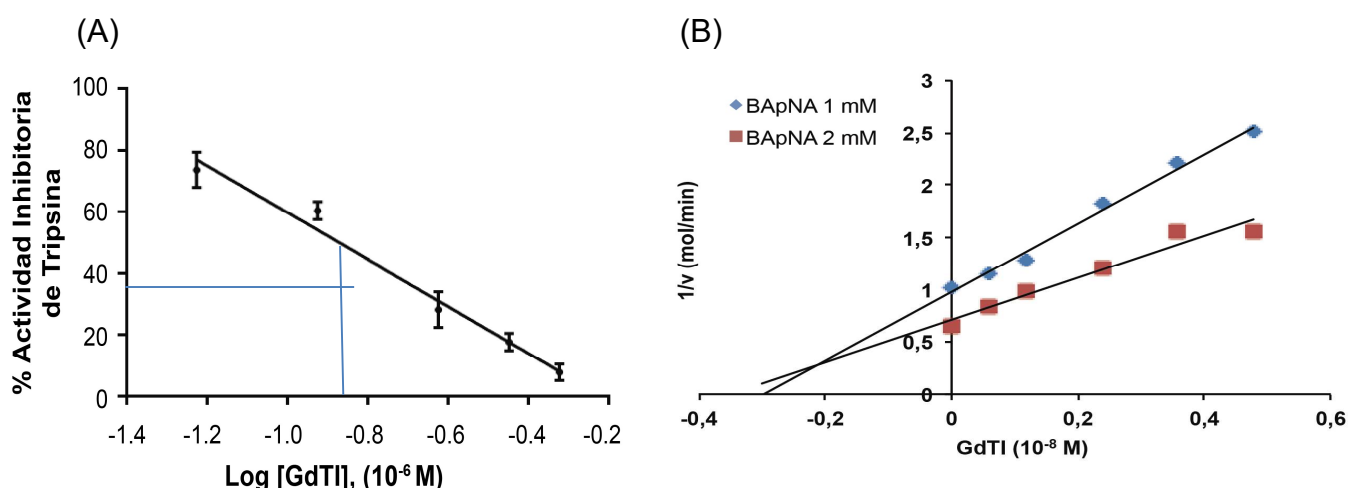


Figura 70: Estudios cinéticos de la actividad inhibitoria de tripsina de GdTI. **(A)** Curva de dosis-respuesta para la determinación del IC₅₀. **(B)** Gráfico de Dixon (1/v vs [I]) para la identificación del parámetro Ki. Cada punto representa la media de tres estimaciones.

Valores de K_i similares fueron informados para otros inhibidores de serín proteasas (Tabla 14). Los valores de K_i en el rango nanomolar indican un fuerte vínculo entre el inhibidor y la proteasa blanco, requiriendo una baja concentración para producir una considerable reducción en la actividad enzimática. La importancia en la búsqueda de moléculas que presenten estas características se basa en la habilidad de ejercer una cierta actividad biológica cuando el inhibidor es entregado en bajas dosis, lo que disminuye fuertemente las posibilidades de producir efectos secundarios indeseados. Además, al requerir bajas dosis de inhibidor para cumplir su función, los costos de producción para su aislamiento y purificación son reducidos considerablemente, lo que lo hace más prometedor para el escalado a nivel industrial.

Tabla 14. Constantes de inhibición de inhibidores de tripsina de plantas.

Nombre/s del inhibidor	K_i (nM)	Referencia
Inhibidor de tripsina de <i>soja</i>	4,6	Deshimaru et al., 2002
Inhibidor de tripsina de <i>Cassia fistula</i>	2,9	Pandey et al., 2016
Inhibidor de tripsina de <i>Sapindus saponaria</i>	2,4	Macedo et al., 2011
Inhibidor de tripsina de <i>Entada acaciifolia</i>	1,75	De Oliveira et al., 2012
Inhibidor de tripsina de <i>Moringa oleífera</i>	1,5	Bijina et al., 2011
Inhibidor de tripsina de <i>Cratylia mollis</i>	1,4	Paiva et al., 2006
Inhibidor de tripsina de <i>Poincianella pyramidalis</i>	1,2	Guimarães et al., 2015
Inhibidor de tripsina de <i>Butea monosperma</i>	1,2	Jamal et al., 2015
Inhibidor de tripsina de <i>Geoffroea decorticans</i>	2,1	-

Se presentan los K_i : constante de disociación, de diferentes inhibidores de tripsina reportados al momento.

4.5. Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF/MS.

Para la determinación de la masa molecular, GdTI fue sometido a un análisis de espectrometría de masas en un espectrómetro de masas Bruker Daltonics, resultando en una señal de 6743,7 Da (Fig. 71). Sin embargo, al realizar la siembra en gel de poliacrilamida (Fig. 72) se observa una masa molecular de aproximadamente 20 kDa, triplicando el valor obtenido por MALDI-TOF/MS.

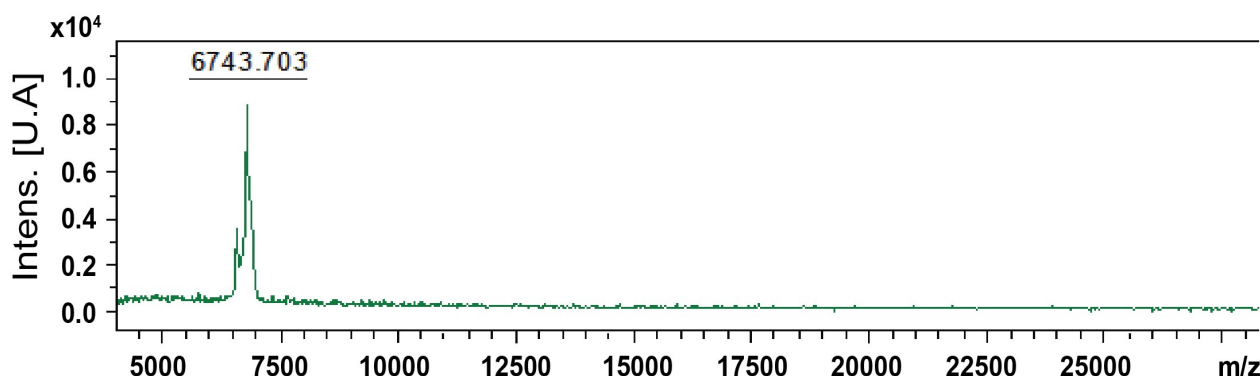


Figura 71. Análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF del inhibidor de tripsina purificado de *Geoffroea decorticans*.

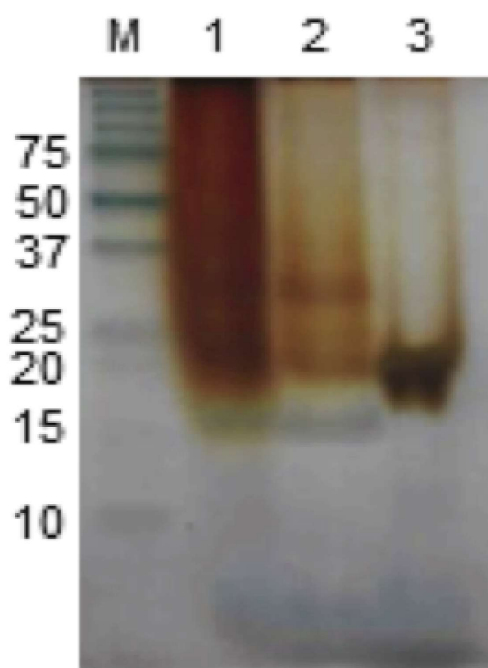


Figura 72: Electroforesis SDS-PAGE teñida con plata, de GdTI purificado. Línea M, marcador de masa molecular; línea 1, extracto crudo de semillas de *Geoffroea decorticans* (GdEC); línea 2, GdEC tratamiento térmico a 90 ° C durante 30 min (GdTT90); línea 3, inhibidor de tripsina de *Geoffroea decorticans* (GdTI).

Estos resultados coinciden con otros reportes en los cuales se observó que muchos inhibidores de tripsina tienen tendencia a auto asociarse, resultando en la formación de dímeros, trímeros y oligómeros complejos cuando están en solución (Wu & Whitaker, 1990; Bergeron & Nielsen, 1993; Godbole et al., 1994; Tereda et al., 1994; Sreerama et al., 1997;

Catalano et al., 2003; Kumar et al., 2004; Losso 2008; Gu et al., 2014). Aunque las condiciones reductoras del SDS-PAGE permitirían la visualización de monómeros de inhibidores de tripsina, otros autores han informado la presencia de bandas correspondientes a diferentes formas tridimensionales de IPPs, concluyendo que la reducción y alquilación de los puentes disulfuro no es completa bajo estas condiciones. Por todo lo anterior, se puede afirmar que el inhibidor de tripsina de chañar tiene una masa molecular de 6743,7 Da con tendencia a la formación de trímeros en solución, incluso bajo las condiciones reductoras usadas en el SDS-PAGE.

4.6. Identificación proteica mediante PMF MALDI-TOF.

GdTI también fue sometido a digestión trípica y posterior análisis por nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masas con tecnología Orbitrap, lo que permitió la separación de los péptidos obtenidos y su posterior identificación. El espectro obtenido fue analizado con el programa Proteome Discoverer 1.4, usando la base de datos Fabaceae. Mediante esta tecnología fue posible identificar un péptido con secuencia SNPPQCR que coincide con los residuos 63-69 del inhibidor de tripsina tipo Bowman-Birk de soja (Glycine max, Número de acceso RZB69152) (Fig. 73). Analizando la secuencia identificada, se pudo observar que pertenece al dominio conservado de los inhibidores de serín proteasas tipo Bowman-Birk (BBI: Bowman-Birk inhibitors), lo cual permite afirmar que GdTI pertenece a esta superfamilia BBI.

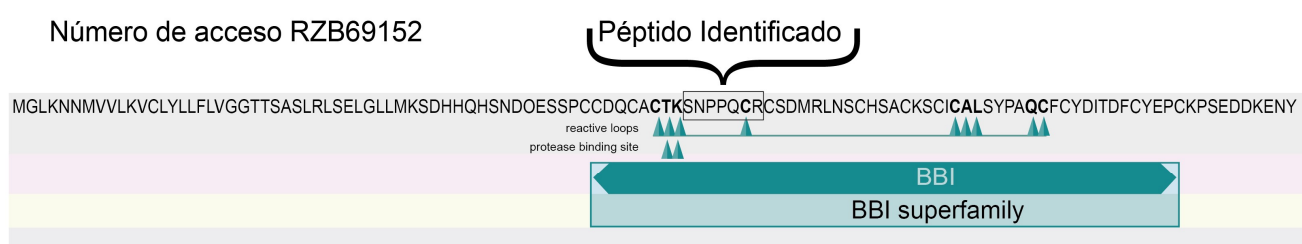


Figura 73: Alineamiento por BLASTP del péptido identificado por nano HPLC-Orbitrap. El número de acceso RZB69152 corresponde al inhibidor de Bowman-Birk de soja. El péptido identificado está encuadrado y la región característica de la superfamilia Bowman-Birk está marcada.

Debido a que estamos en presencia de la primera proteína aislada de chañar, una especie vegetal cuyo genoma no está secuenciado, no fue posible identificar otros péptidos, lo cual es consistente con la naturaleza única del inhibidor estudiado en este trabajo.

4.7. Estabilidad a la temperatura y el pH.

Varios IPPs vegetales han sido purificados y se encontró que son altamente estables y activos hasta los 70 °C (Prathibha et al., 1995; Torres-Castillo et al., 2009; Souza et al., 2014; Cotabarren et al., 2018; Martins et al., 2018). Incluso se han encontrado IPPs estables en un amplio rango de temperatura, manteniendo su actividad luego de ser incubados a temperaturas cercanas a los 100 ° C. Además, un estudio de estabilidad indicó que los IPPs vegetales eran funcionalmente estables dentro de diferentes rangos de pH, e incluso bajo condiciones altamente ácidas y alcalinas (pH 2–12). A valores de pH extremos, la fuerte repulsión electrostática intramolecular causada por una alta carga neta da como resultado el desplegamiento y desnaturalización de las moléculas proteicas. Sin embargo, los puentes disulfuro intramoleculares son presumiblemente responsables de la estabilidad funcional de algunos IPPs en presencia de diversos agentes desnaturalizantes físicos y químicos, no solo frente al pH, sino también frente a la temperatura y ciertos agentes reductores. Por esta razón, los IPPs se encuentran entre las proteínas más estables encontradas en la naturaleza (Cotabarren et al., 2020a). Para la mayoría de las aplicaciones biotecnológicas, se necesitan proteínas altamente termoestables, para disminuir el impacto ambiental de la actividad industrial (Cavicchioli et al., 2011). Por esto, el descubrimiento de nuevas proteínas con estabilidad a temperaturas y pHs extremos es una herramienta útil para su aplicación en un amplio rango de procesos biotecnológicos, permitiendo un uso racional de recursos naturales y siendo un requerimiento clave para la explotación comercial (Reed et al., 2013).

El inhibidor purificado fue sometido a diferentes temperaturas y pHs con el objetivo de demostrar su estabilidad en estas condiciones. Para esto, una muestra de GdTI (16 µg/mL) fue incubada a temperaturas entre 40 y 100 ° C o pHs entre 2–12 (Cap. 4 Sec. 3.9), luego de lo cual se evaluó la actividad inhibitoria de tripsina residual bajo condiciones de ensayo estándar usando BApNA como sustrato y de acuerdo a lo descrito previamente en la Cap.2 Sec. 1.3.1. En estas pruebas fue posible mostrar que GdTI es estable en todas las condiciones utilizadas, manteniendo $100 \pm 4\%$ y $79 \pm 5\%$ de su actividad inhibitoria promedio a temperaturas y pHs extremos, respectivamente (Figs. 74. A y 74. B).

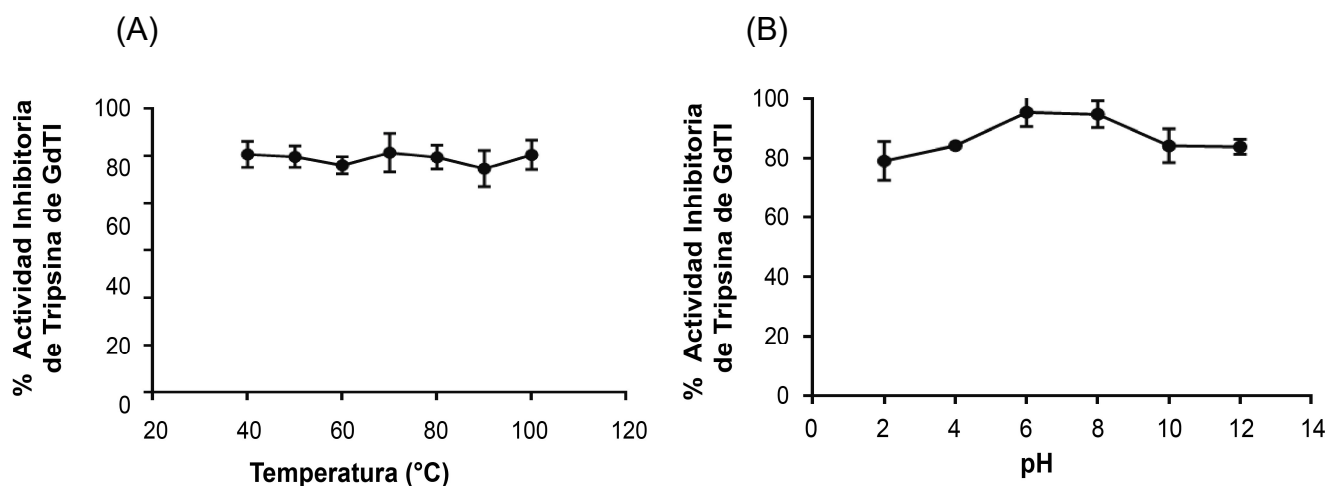


Figura 74: Estabilidad a la temperatura y el pH del inhibidor de tripsina de *Geoffroea decorticans*. **(A)** Actividad inhibitoria de tripsina residual luego de la incubación de GdTI a temperaturas desde 40 hasta 100 °C por 60 min. **(B)** Actividad inhibitoria de tripsina residual luego de la incubación de GdTI a pHs desde 2 hasta 12 por 60 min.

También se realizaron incubaciones a altas temperaturas (90 y 100 °C) por tiempo prolongado, donde fue posible observar que incluso luego de incubar a GdTI por 5 horas a altas temperaturas, la actividad inhibitoria de tripsina no se modifica, mostrando un $99 \pm 5\%$ de su actividad promedio (Figs. 75. A y 75. B).

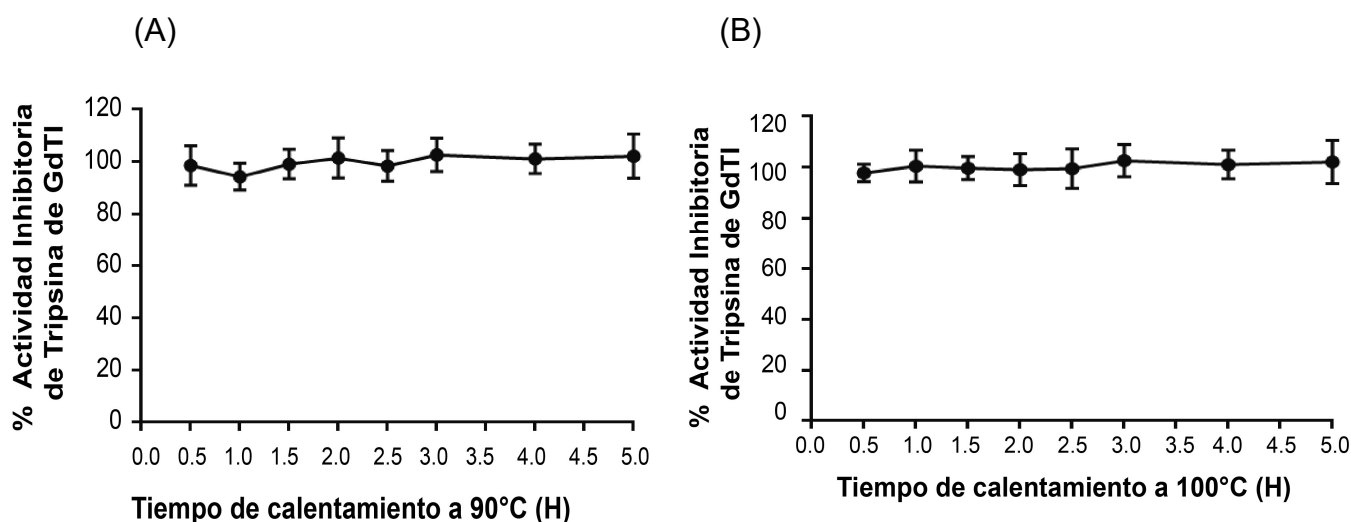


Figura 75: Estabilidad a la temperatura a tiempos prolongados del inhibidor de tripsina de *Geoffroea decorticans*. **(A)** Actividad inhibitoria de tripsina residual luego de la incubación de GdTI a 90 °C por 0,5-5 h. **(B)** Actividad inhibitoria de tripsina residual luego de la incubación de GdTI a 100 °C por 0,5-5 h.

Considerando que la actividad bioquímica de una proteína depende del mantenimiento de su conformación nativa, es evidente que GdTI es una proteína inusualmente estable resistiendo a los tratamientos térmicos y pHs por largos períodos y preservando su

conformación nativa con alta bioactividad. Aunque este comportamiento es comparable con varios tipos de inhibidores de tripsina, la estabilidad fisicoquímica por tiempos tan prolongados no ha sido previamente evaluada (Tabla 15). Puede verse que el inhibidor de *Luetzelburgia auriculata* Bowman-Birk mantiene su actividad inhibitoria de tripsina en 90% luego de 2 horas de incubación a 98 °C (Martins et al., 2018), mientras que el inhibidor de tripsina de la soja silvestre (Deshimaru et al., 2002) y de *Hyptis suaveolens* (Aguirre et al., 2004) mantienen su actividad inhibitoria luego de 60 min de incubación a 90 y 94 ° C respectivamente. Estos resultados son muy prometedores debido a que las moléculas de origen natural, con bajo peso molecular y estabilidad fisicoquímica ofrecen la ventaja de ser fácilmente usadas en un amplio rango de aplicaciones, tanto en la industria de alimentos, biotecnología agrícola o ciencia farmacéutica (Shamsi et al., 2016).

Tabla 15. Inhibidores de tripsina de origen vegetal con estabilidad a temperatura y pH.

Nombre/s del inhibidor	Tratamiento térmico			Tratamiento de pHs			Referencia
	Rango de temperatura (°C)	Tiempo (min)	AI (min)	Rango de pH	Tiempo (min)	AI (min)	
C11PI	20-80	30	85	2-12	60	85	Swathi et al., 2014
BgPI	37-100	30	80	2-12	60	95	Prasad et al., 2010
Pal	30-90	30	99	1-13	30	75	Haq et al., 2005
CmTI	20-100	30	100	2-10	30	100	Paiva et al., 2006
CFPI	37-100	30	95	2-10	60	85	Dantzger et al., 2015
MpBBI	40-100	10	100	2-13	30	100	Indarte et al., 2017
RsBBI1	40-100	30	95	2-12	60	100	Mohanraj et al., 2018
WSTI	90	60	100	2-12	60	95	Deshimaru et al., 2002
HSTI	4-94	60	100	3-10,7	60	100	Aguirre et al., 2004
LzaBBI	98	120	90	2-11	180	80	Martins et al., 2018

AI: actividad inhibitoria. C11PI: inhibidor de tripsina de *Cajanus cajan* cv. "frijol de palo" ICP 7118; BgPI: inhibidor de tripsina de *Black gran*; Pal: inhibidor de tripsina de *Phaseolus aureus* "frijol mungo"; CmTI: inhibidor de tripsina de *Cratylia mollis*; CFPI: inhibidor de tripsina de *Clitoria fairchildiana* "sombreiro" ; MpBBI: inhibidor de tripsina de *Maclura pomifera* "naranja de los osages"; RsBBI1: inhibidor de tripsina de *Rhynchosia sublobata* "Meikle"; WSTI: inhibidor de tripsina de Wild Soja; HSTI: inhibidor de tripsina de *Hyptis suaveolens* "Chan"; LzaBBI: inhibidor de tripsina de *Luetzelburgia auriculata*.

Luego de una extensa búsqueda literaria, se pudo apreciar que solo unos pocos de los IPPs con alta estabilidad a temperaturas y pHs extremos tienen actividades biológicas. La mayoría de estos inhibidores tienen potencial como biopesticidas, con actividad inhibitoria sobre proteasas intestinales de insectos y/o inhibición del crecimiento larvario: HSTI (Aguirre et al., 2004), C11PI (Swathi et al., 2014), CFPI (Dantzger et al., 2015) y RsBBI1 (Mohanraj et al., 2018). Otras actividades biológicas informadas fueron actividad antibacterial en *S. aureus* por LzaBBI (Martins et al., 2018) y actividad anticoagulante en la vía de coagulación extrínseca por MpBBI (Lazza et al., 2010). Aunque los IPPs de origen vegetal con alta estabilidad fisicoquímica facilitarían el almacenamiento y las condiciones de aplicación, las actividades biológicas de éstos IPPs han sido muy poco exploradas.

4.8. Actividad anticoagulante.

Como se nombró anteriormente, aunque una gran variedad de actividades biológicas ha sido estudiada para los inhibidores de tripsina de origen vegetal (por ejemplo, actividad anticancerígena, anti-inflamatoria, anti-angiogénica, y antimicrobiana), actividades como la anticoagulante e hipoglucemiante fueron escasamente informadas. En el caso de la actividad anticoagulante del inhibidor de tripsina de *Leucaena leucocephala* (Oliva et al., 2000), *Enterolobium contortisiliquum* (Batista et al., 1996) y *Maclura pomifera* (Lazza et al., 2010) fue informado dicha actividad para el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), pero no el tiempo de protrombina (PT). Esto indicaría que el efecto anticoagulante de estos inhibidores es ejercido preferentemente en la vía de coagulación intrínseca.

Para el caso de GdTI se evaluaron, nuevamente, ambas vías de coagulación con concentraciones crecientes del inhibidor. De los resultados obtenidos se observó que para la misma concentración de GdTI hay un retraso más pronunciado en el tiempo de coagulación para aPTT comparado con el tiempo requerido para PT (Figs. 76. A y 76. B). Por ejemplo, agregando 22 μ M de inhibidor en la prueba de PT, se observó un retardo en el tiempo de coagulación de 18 a 26 seg, mientras que en la prueba de aPTT fue posible retardar el tiempo de coagulación, con la misma concentración de GdTI, de 51 a 110 seg. Por lo tanto, el inhibidor de tripsina de chañar (GdTI) retrasa fuertemente el tiempo de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, mientras que para la vía extrínseca se requieren mayores concentraciones para producir el mismo efecto.

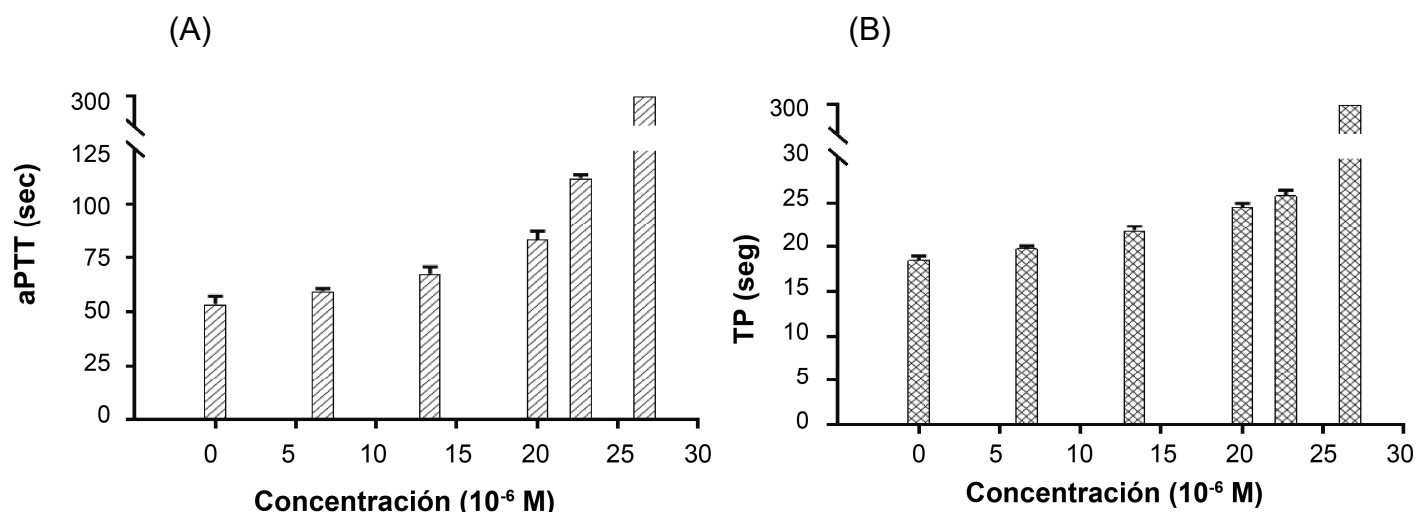


Figura 76: Act. anticoagulante GdTI en tromboplastina parcial activada (aPTT) y protrombina (PT).
(A) Tiempos de coagulación con diferentes concentraciones de GdTI en aPTT.
(B) Tiempos de coagulación con diferentes concentraciones de GdTI en PT.

Como comparación, la heparina, una droga de uso común como agente anticoagulante en una concentración de 333 μM produce un retardo en el tiempo de coagulación para la ruta aPTT de 18 a 300 seg (Indumathi & Mehta, 2016), mientras que GdTI produce el mismo efecto en concentraciones de 26 μM . Estos resultados incentivan futuros estudios del mecanismo de acción de GdTI y el desarrollo de ensayos in vivo que podrían ser prometedores para una potencial explotación de este inhibidor como un agente antitrombótico natural. Este estudio no solo remarca la capacidad anticoagulante de GdTI, sino que también demuestra que es el primer inhibidor de proteasa vegetal con un efecto en la vía extrínseca de coagulación.

4.9. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

Como se había observado en el capítulo 2, los extractos de chañar GdEC y GdTT habían sido los más interesantes en cuanto a su actividad hipoglucemiante, mostrando valores de inhibición de actividad α -glucosidasa de 51,5 $\pm$ 2,1 para GdEC y de 72,6% $\pm$ 1,8 para GdTT (Fig. 77).

Sería interesante demostrar que la fracción proteica GdTI es en parte responsable de dicha actividad, a pesar de ser un inhibidor de proteasa, ya que no se han encontrado reportes que demuestren una función dual en este tipo de moléculas.

De hecho, las pruebas de actividad hipoglucemiante no son frecuentes en la caracterización de las actividades biológicas de los IPPs, siendo mayormente informadas para

productos peptídicos obtenidos a partir de hidrolizados proteicos (Konrad et al., 2014; Wang et al., 2019). Sin embargo y sorprendentemente en este trabajo se demostró que GdTI inhibe la enzima α -glucosidasa mostrando una IC_{50} de 0,18 μ M (equivalente a 1,21 μ g/mL).

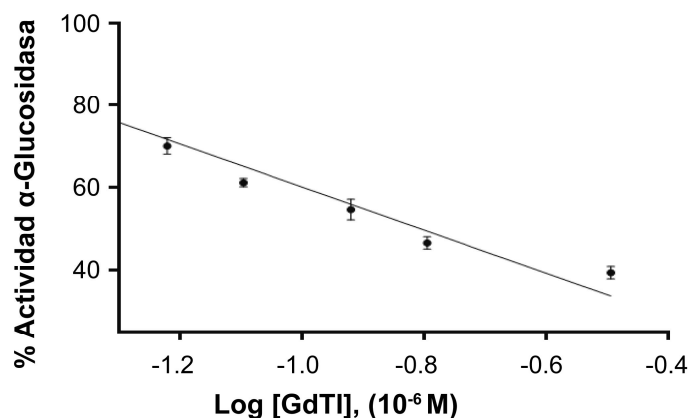


Figura 77: Actividad inhibitoria del inhibidor de tripsina de *Geoffroea decorticans* contra α -glucosidasa.

Péptidos de hidrolizados de proteína de suero mostraron actividad inhibitoria de α -glucosidasa con $IC_{50} = 3,5$ mg/mL (Konrad et al., 2014). Niveles similares de inhibición de α -glucosidasa fueron informados por Matsui et al., (1999) y Yu et al., (2011). De acuerdo con tales resultados, es posible observar que GdTI inhibe fuertemente la enzima α -glucosidasa, siendo capaz de tener efectos directos en la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Este efecto sumado a la capacidad anticoagulante demostrada previamente por este inhibidor, la convierte en una molécula con gran potencial para el desarrollo de una droga natural para su utilización en diversas patologías de desórdenes metabólicos y/o cardiovasculares.

4.10. Actividad antioxidante.

Los resultados de actividad antioxidante para GdTI fueron los siguientes: 20% de inhibición para el método de ABTS y 5% de inhibición para el método de DPPH. En ambos casos el porcentaje de inhibición es referido a la actividad de captura del radical ABTS y DPPH, respectivamente. En las mismas condiciones los resultados obtenidos para GdEC fueron: 94% (ABTS), 98 % (DPPH) y para GdTT 97% (ABTS), 95 % (DPPH). Al analizar estos resultados y compararlos con los porcentajes de inhibición obtenidos para GdTI se evidencia que un gran porcentaje de la actividad antioxidante pudiera estar en otra fracción proteica de estos extractos. Por todo lo expuesto y analizado se puede concluir que GdTI es mínimamente responsable de la actividad antioxidante que presentan los extractos de Chañar.

5. Conclusiones de este capítulo.

En este capítulo se presenta no solo el primer reporte de un inhibidor de proteasa aislado a partir de semillas de chañar, sino que también representa la primera proteína aislada, purificada y caracterizada de dicha planta. GdTI es un potente inhibidor de tripsina con elevada estabilidad térmica que presenta actividad inhibitoria de las vías de coagulación (intrínseca y extrínseca). Además, GdTI presenta inesperadamente actividad inhibitoria de la enzima α glucosidasa.

Resumen de conclusiones específicas.

- Se obtuvo nuevamente un extracto crudo (GdEC) con un contenido proteico total de $171,2 \pm 8,7$ $\mu\text{g/mL}$ y actividad inhibitoria de tripsina de $21,35 \pm 3,25$ UIT.
- El tratamiento térmico de GdEC a 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 °C por 30 min mantuvo la actividad inhibitoria de tripsina.
- Se obtuvo una IC_{50} de $0,66 \pm 0,17$ $\mu\text{g/mL}$ para el tratamiento térmico a 90 °C (GdTT90) y una IC_{50} de $0,55 \pm 0,18$ $\mu\text{g/mL}$ para el tratamiento térmico a 100°C (GdTT100).
- A partir de GdTT90 purificó un inhibidor de tripsina (GdTI) mediante cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad.
- GdTI mostró una actividad inhibitoria específica de $75,98 \pm 4,77$ UIT/mg proteína respectivamente, con un rendimiento final de 39,8% respecto al material de partida.
- GdTI mostró una IC_{50} de 0,22 μM y una K_i de 2,1 nM, indicando que la actividad inhibitoria de tripsina ocurre a muy bajas concentraciones, caracterizando un inhibidor muy potente.
- GdTI fue sometido a un análisis de espectrometría de masas en un espectrómetro de masas Bruker Daltonics, resultando en una señal de 6743,7 Da.
- GdTI conserva un $100 \pm 4\%$ y $79 \pm 5\%$ de su actividad inhibitoria promedio a temperaturas y pHs extremos, respectivamente.
- GdTI retrasa fuertemente el tiempo de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, en concentración 22 μM de inhibidor, se observó un retardo en el tiempo de coagulación de 18 a 26 seg.
- GdTI retrasa moderadamente la prueba de aPTT, retardando el tiempo de coagulación, en concentración 22 μM de inhibidor, de 51 a 110 seg.
- GdTI inhibe la enzima α -glucosidasa mostrando una IC_{50} de 0,18 μM (equivalente a 1,21 $\mu\text{g/mL}$).
- GdTI presenta muy baja actividad antioxidante mediante los métodos de ABTS y de DPPH.

CAPÍTULO 5

Aislamiento y caracterización de un inhibidor de serín proteasa obtenido a partir de semillas de *Capsicum annuum* (YBPTI). Potencial aplicación como agente antioxidante, antifúngico e hipoglucemiante.

1. Introducción.

1.1. Resumen de las propiedades nutricionales y medicinales del *Capsicum annum*.

El pimiento o morrón es mundialmente conocido por su alto valor nutricional, sus beneficios para la salud y sus propiedades medicinales. Es rico en vitaminas y minerales, tiene propiedades antimicrobianas y anticancerígenas. Se ha observado que algunas variedades de pimiento poseen propiedades preventivas y terapéuticas para muchas dolencias como diferentes tipos de cáncer, reumatismo, rigidez en las articulaciones, bronquitis y resfriados de pecho con tos y dolor de cabeza, artritis, arritmias cardíacas y muchas otras dolencias. Por lo tanto, es importante realizar estudios con el propósito de revelar y resaltar los potenciales usos medicinales y los beneficios para la salud de esta conocida planta, ampliamente consumida, para alentar trabajos de investigación que permitan profundizar los conocimientos de sus componentes moleculares naturales (Saleh et al., 2018).

1.2. Proteasas serínicas y sus inhibidores.

Según descrito en la Sec. 1.2. del Cap. 4. Proteasas serínicas e inhibidores de proteasas serínicas, Inhibidores de serín proteasas, Inhibidores de tripsina.

2. Objetivos de este capítulo.

En base a los resultados obtenidos que indicaron que MAEC y MATT presentaron actividad inhibitoria de tripsina, se decidió continuar con la purificación y caracterización de dicho inhibidor. Además, por lo observado en el capítulo 2 sobre la caracterización de los extractos de morrón amarillo, se verificará en este capítulo si el inhibidor de tripsina de morrón amarillo pudiera ser, en parte, responsable de las actividades antioxidante y antifúngica que presentaban sus extractos (MAEC y MATT). Adicionalmente se incorporó el estudio de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa.

- Purificar parcialmente y caracterizar bioquímicamente al inhibidor de proteasa serínico (YBPTI).
- Corroborar si YBPTI es en parte, responsable de la actividad antifúngica evaluando su actividad sobre cepas de diferentes especies de Cándidas.
- Corroborar si el inhibidor posee otra actividad biológica que puedan ampliar su caracterización, como ser, actividad anticoagulante y actividad inhibitoria de la enzima α - glucosidasa.

3. Metodología

3.1. Aislamiento y caracterización biológica del inhibidor de tripsina de morrón amarillo.

Según técnica descrita en el Cap. 2.3.

3.2. Purificación parcial mediante tratamiento térmico.

De la misma manera a la descrita en los capítulos anteriores, Cap. 3. Sec. 3.2, se busca si el IPP a estudiar posee estabilidad térmica. Además, teniendo en cuenta los resultados del capítulo 2 en el cual el tratamiento térmico de MAEC (360 µg/mL) genera MATT (240 µg/mL), clarificando la muestra en 1/3 de su contenido proteico y conservando la actividad inhibitoria de tripsina en un 100 %, se realizó una purificación parcial de los extractos crudos por aplicación de tratamiento térmico.

Para ello, las muestras fueron tratadas térmicamente por calentamiento a 100 °C en baño de agua durante 5 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 6000 g y 4 °C durante 30 min. El sobrenadante obtenido, al que denominamos MATT, fue analizado para volver a verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente.

3.3. Purificación mediante técnicas cromatográficas. Cromatografía de afinidad a tripsina.

Se realizó según la metodología descrita en el Cap. 3. Sec. 3.3.

3.4. Ensayos de estabilidad.

3.4.1. Efecto de la temperatura.

Para el ensayo de estabilidad térmica, alícuotas de YBPTI fueron incubadas a una temperatura fija de 100 °C por 0,5, 1, 1,5, 2,5 y 3 horas. Luego de que estas alícuotas fueran enfriadas a temperatura ambiente, las proteínas desnaturalizadas térmicamente fueron removidas por centrifugación durante 30 minutos a 6000 g y 4 °C y la actividad inhibitoria de tripsina residual del sobrenadante fue determinada usando BApNA como sustrato como se describió previamente en el Cap. 3. Sec. 3.4.

3.4.2. Efecto del pH.

Se determinó la estabilidad del YBPTI a valores extremos de pH. Para ello, alícuotas del mismo fueron incubadas a pH 2 y pH 12 durante 30 y 60 minutos a 25 °C, con agitación a 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, las alícuotas se neutralizaron, se centrifugaron 30 minutos a 6000 g y 4°C y se determinó la actividad inhibitoria residual de tripsina de la misma forma que se describe en el Cap. 3 Sec. 3.5.

Tanto para este ensayo como para el de estabilidad térmica, la cantidad de muestra utilizada en cada ensayo fue de 20 µl, independientemente de la cantidad de proteínas que haya quedado soluble luego de cada tratamiento. Esto es así ya que el propósito de este ensayo es, justamente, verificar la población de proteínas estables que permanecen activas luego de cada tratamiento.

3.5. Actividad antioxidante.

Según la técnica descripta en el Cap. 2. Sec. 1.3.

En particular para el YBPTI, se realizó el ensayo diluyendo el ABTS en buffer fosfato 50 mM pH 7,4 y llevando la absorbancia inicial a 1 ± 0.01 . Se utilizaron diferentes concentraciones del inhibidor YBPTI (desde 0 a 3,478 µg/mL), con el objetivo de analizar el efecto de la concentración del mismo sobre su actividad antioxidante frente al sustrato ABTS diluido.

3.6. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

Se procedió con la metodología del Cap. 2. y Sec. 1.7.

En este caso, la curva para la determinación de la IC₅₀ se realizó de la siguiente manera: una cantidad fija de 10 µl de α -glucosidasa (0,5 U/mL) con diferentes concentraciones del inhibidor YBPTI (desde 0 a 689 ng/mL) en buffer fosfato de sodio 0,01 M (pH 7,4).

Como en los casos anteriores, las medidas se realizaron por triplicado y se incluyeron los blancos apropiados correspondientes a H₂O destilada estéril y, además, se incluyó un control de concentración de sales (control NaCl 25 mM), con el objetivo de probar que la inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa por parte del YBPTI se debía exclusivamente a la presencia del inhibidor en la muestra y no a las sales presentes en la misma.

3.7. Actividad Antimicrobiana.

Se analizaron las muestras de YBPTI frente a diferentes patógenos.

3.7.1. Actividad antibacteriana y antifúngica.

Se procedió con la metodología del Cap. 2. Sec. 1.8 y 1.9. de caracterización de EPVs.

Para la determinación de actividad antibacteriana se trabajó con las siguientes cepas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

Para determinar la capacidad inhibitoria del crecimiento fúngico se trabajó con las especies *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Rhodotorula* spp y el hongo patógeno alimentario *Saccharomyces cerevisiae*.

3.7.2. Análisis por microscopía óptica.

Después de 20 h del ensayo de inhibición del crecimiento de levadura, las levaduras se visualizaron usando un microscopio óptico con un aumento de 1000 x (Nikon Eclipse OPT-01514) por observación directa y con 30 min de incubación con colorante azul de metileno (relación 1:1). También se determinaron las células de levadura cultivadas en ausencia de inhibidor (células control).

3.7.3. Ensayo de absorción de SYTOX Green.

La permeabilización de la membrana plasmática de las células se midió mediante la absorción del colorante SYTOX Green (Molecular Probes Invitrogen, EUA), como se describió anteriormente por Thevissen et al., (1999,) con algunas modificaciones. Se incubaron células de *C. albicans* (9×10^7 UFC/mL) en presencia de inhibidor a la concentración de 183,96 µg/mL durante 20 h. Se incubaron alícuotas de la suspensión de células de levadura con SYTOX Green 0,2 µM (proporción 1:1) durante 20 min a 25 °C. También se realizó un control negativo, sin el agregado de YBPTI.

Las células se observaron en un microscopio óptico (IMLD Biosystems) equipado con un conjunto de filtros de fluorescencia para la detección de fluoresceína. Dado que el SYTOX Green presenta una fluorescencia 500 veces superior tras unirse a ácidos nucleicos, una incubación breve de células muertas con este colorante resultó en una fluorescencia verde brillante con un máximo de emisión de 523 nm cuando se excita con cualquier fuente de 450 a 490 nm.

La prueba consiste en dos simples pasos. Primero se enfoca un campo de interés utilizando la fuente de luz normal, que emite en el visible y permite obtener la imagen óptica. Posteriormente, sin mover el campo observado previamente, se establecen las condiciones de oscuridad de la habitación y se cambia el modo de emisión del microscopio al modo de fluorescencia, registrando las fotografías correspondientes.

3.7.4. Ensayo de citotoxicidad celular, por el ensayo colorimétrico de tretazolium (MTT).

La viabilidad celular se analizó por el método de MTT (proliferación). El método utilizado fue el de Mosmann (1983) modificado por Twentymen y Luscombe (1987), el cual mide la reducción de las sales de tetrazolium (amarillo) a formazán (violeta) por medio de las enzimas deshidrogenadas presentes en las mitocondrias de las células vivas.

Para este análisis se sembraron 1×10^4 células por pozo en placas 96 wells. Se cultivaron durante 24 hs. Luego se reemplazó el medio de cultivo por el YBPTI y sus correspondientes controles (negativos, medio sin acondicionar y positivos, medio con etanol al 5 %). Se cultivaron en estufa a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se adicionó a cada pozo una solución de MTT preparada en medio de cultivo (0,5 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 3 h. Pasado este tiempo se eliminó el sobrenadante de los pozos, se adicionaron 100 ul de DMSO para disolver el formazán producido y se leyó la placa en un espectrofotómetro de placa a una absorbancia a 540 nm. Una disminución de la absorbancia indica la pérdida de funcionalidad de las mitocondrias.

4. Resultados y discusiones

4.1. Estudio de la actividad inhibitoria de tripsina de los extractos de morrón amarillo y purificación parcial por tratamiento térmico.

Se obtuvo el extracto crudo denominado MAEC ($162,46 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$), con actividad inhibitoria de tripsina con un valor de inhibición de $98,20 \pm 0,44\%$. Al evaluar estos resultados se comenzó con los pasos de purificación de los inhibidores presentes en el MAEC. Como primer paso, se procedió a un tratamiento térmico del extracto crudo que contenía $162,46 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ de proteínas. El tratamiento consistió en un calentamiento del MAEC a 100°C durante 5 min, luego se centrifugó y finalmente al sobrenadante se lo denominó MATT; tal como se detalla en la metodología del Capítulo 2. Este es un paso de purificación simple y rápido, que se realiza inicialmente con el objetivo de obtener en solución una mayor concentración de inhibidores. Posteriormente se realizó una cuantificación proteica y un ensayo de cinética de inhibición para que verificar la presencia de inhibidores de tripsina estables térmicamente en el MATT. Los resultados permitieron poner en evidencia, nuevamente, que en la muestra MATT había inhibidores de tripsina termoestables, cuya concentración proteica total fue de $155,14 \pm 0,0022 \mu\text{g/mL}$ y el porcentaje de inhibición obtenido fue de $97,34 \pm 0,95\%$.

Mediante esta estrategia de purificación parcial fue posible reducir el contenido proteico total en el MAEC tratado térmicamente sin pérdida significativa de la actividad inhibitoria de tripsina, demostrando la enorme estabilidad fisicoquímica de los IPPs presentes en las semillas de morrón amarillo. De esta manera se establece que el tratamiento térmico de 5 minutos de incubación a 100°C constituye un método simple y efectivo para la remoción de proteínas termolábiles, por lo tanto, MATT fue seleccionada como una muestra inicial para ser sembrada en la columna de cromatografía de afinidad a tripsina, para continuar los pasos de purificación.

4.2. Purificación del inhibidor de tripsina mediante técnicas cromatográficas.

4.2.1. Purificación mediante cromatografía de afinidad.

Con el objetivo de continuar con el proceso de purificación del inhibidor se realizó una cromatografía de afinidad del extracto MATT en una matriz conteniendo tripsina inmovilizada en glioxil agarosa, de acuerdo al procedimiento descrito en el Cap. 3. Sec. 3.1. y en el Cap. 4. Sec. 3.6. En primera instancia la columna se equilibra con el buffer de corrida, a continuación, se realiza la siembra y se deja correr un volumen de buffer hasta la salida del pico no retenido. Luego, para la elución del inhibidor, se genera un descenso progresivo del pH, cambiando gradualmente el buffer de elución por HCl $0,05\text{ M}$ para lograr la

desestabilización del complejo tripsina-inhibidor. De esta manera, aproximadamente a los 45 mL de iniciada la corrida, se obtuvo un pico de absorbancia a 215 nm (longitud de onda a la que se detectan enlaces peptídicos), 280 nm (longitud de onda a la que se detectan aminoácidos aromáticos) y 330 nm (longitud de onda a la cual pueden llegar a detectarse algunos pigmentos).

Esta fracción con actividad inhibitoria de tripsina se denominó YBPTI. El resultado de la cromatografía se muestra en la Figura 78.

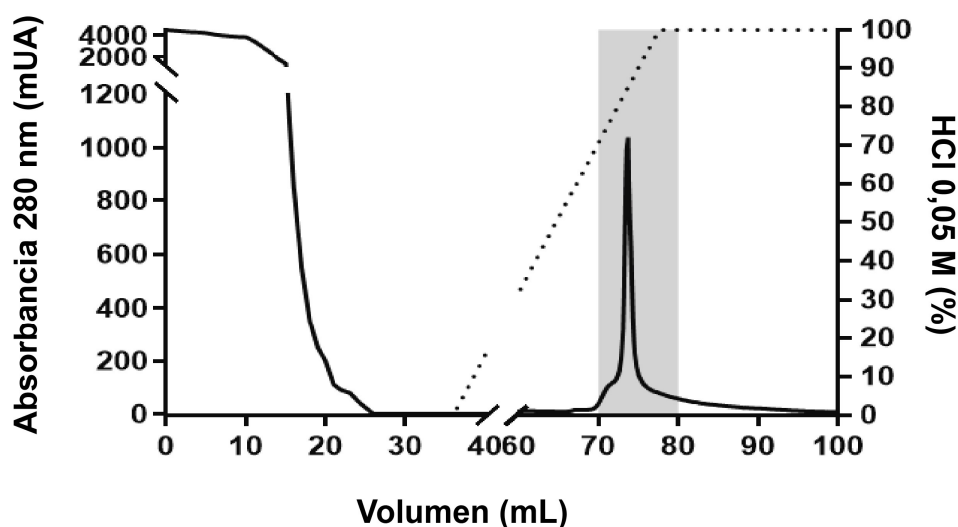


Figura 78: Cromatografía de Afinidad a Tripsina. El cromatograma muestra una fracción no retenida eluída a pH 8 y una fracción retenida con actividad inhibitoria de tripsina eluída a pH 1. La fracción eluída a pH 8 (dentro de la franja gris) corresponde a YBPTI.

A continuación, se realizó la actividad inhibitoria de tripsina. Estos resultados permitieron poner en evidencia que YBPTI conserva gran parte de su actividad inhibitoria ya que, como se puede observar en la Figura 79.A, continúa produciendo una marcada disminución en la pendiente de la curva de inhibición, lo cual demuestra que, luego del paso de purificación aún se encuentra presente, al menos, un inhibidor de tripsina en la muestra. En la parte b) de la misma figura se ve más claramente la actividad inhibitoria de tripsina que presenta YBPTI, a diferencia del control sin inhibidor, quien no presentó inhibición. De esta manera, YBPTI presentó una concentración de $22,59 \pm 0,0029 \mu\text{g/mL}$ y el porcentaje de inhibición fue del $63,74 \pm 5,94\%$ (Figura 79.B).

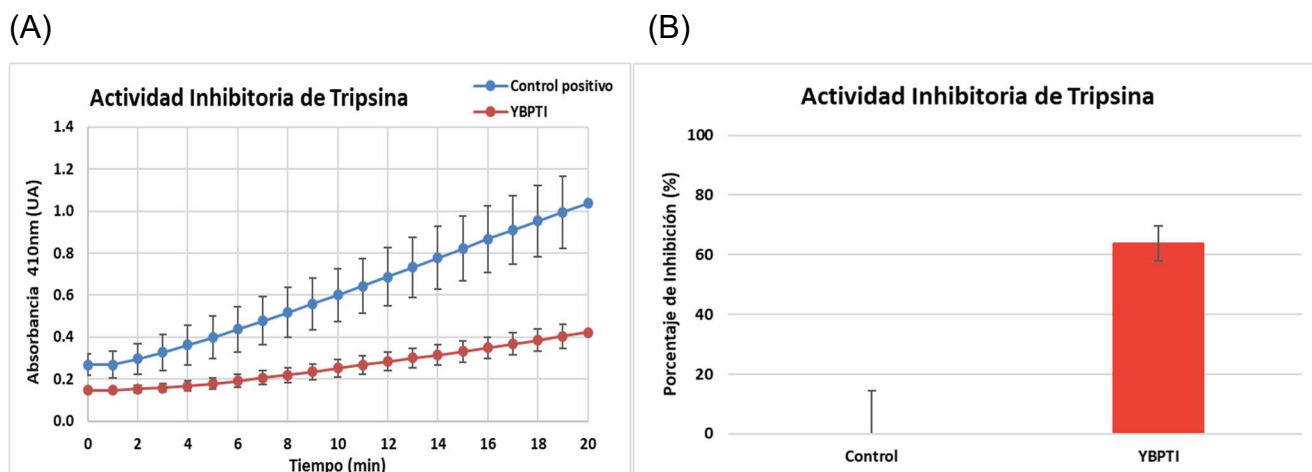


Figura 79: Actividad inhibitoria de tripsina de YBPTI obtenido de la cromatografía de afinidad, representada como **(A)** la variación de la absorbancia a 410 nm con el tiempo, y **(B)** como el porcentaje de actividad inhibitoria de tripsina. La curva azul en **(A)** hace referencia a un control que corresponde a la actividad de tripsina con el sustrato BApNA sin la adición de inhibidor (control positivo); mientras que la curva roja, en cambio, corresponde a la actividad de tripsina en presencia tanto del sustrato BApNA como del inhibidor (YBPTI). Lo mismo ocurre en el gráfico **(B)** de barras, en donde el porcentaje de inhibición del control es insignificante y, en contraste, el del YBPTI (rojo) tiene un valor de $63,74 \pm 5,94\%$.

A continuación, se realizaron ensayos para determinar IC_{50} y la constante cinética de inhibición K_i . El primer experimento fue llevado a cabo midiendo la actividad inhibitoria de la muestra a distintas concentraciones proteicas (curva dosis-respuesta), hasta que la actividad enzimática disminuyó completamente; obteniendo como resultado un valor de IC_{50} de $3,9 \mu\text{g/mL}$. Los ensayos para determinar K_i se realizaron a concentraciones crecientes de muestra y 2 concentraciones fijas de sustrato, luego se expresaron los valores de $1/v$ vs. $[I]$ (concentración de Inhibidor) y se calculó el valor de K_i a partir de la intersección de las dos curvas; obteniendo como resultado una concentración de $1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$ (Fig. 80).

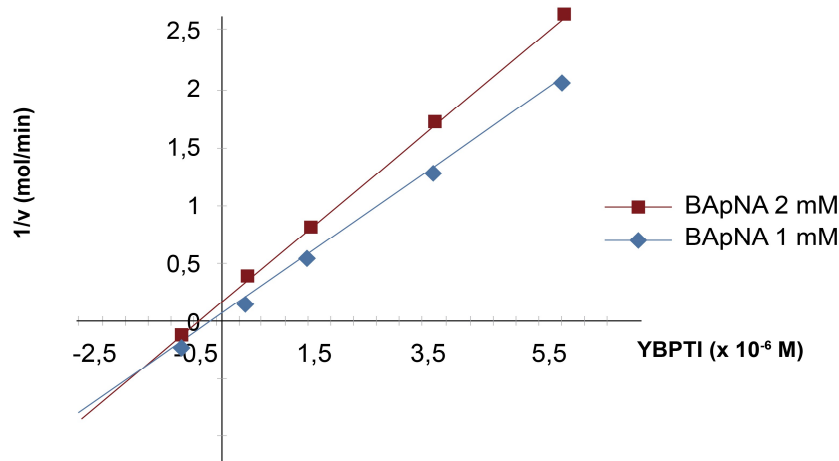


Figura 80: Determinación de la constante cinética de inhibición para YBPTI.

Este valor se encuentra dentro del rango de otros valores de K_i obtenidos para otros inhibidores de serín proteasas reportados, por ejemplo: inhibidor de proteasa aislado de *B. microplus larvae* ($K_i = 1,20 \times 10^{-7}$ M) (Tanaka et al., 1999); el inhibidor de tipo Kunitz aislado de *Boophilus microplus* ($K_i = 1,08 \times 10^{-7}$ M) (Sasaki et al., 2006); y el inhibidor de tripsina aislado de *Torresea cearensis* (TcTI, $K_i = 1,4 \times 10^{-6}$ M) (Tanaka et al., 1989).

A modo de resumen, se presentan a continuación en la Tabla 16., todos los pasos de purificación realizados hasta obtener YBPTI. De esta manera, bajo las condiciones de trabajo seleccionadas, la cromatografía de afinidad fue efectiva para la remoción de las proteínas no afines a tripsina, observando que la actividad inhibitoria de tripsina específica aumentó aproximadamente unas 60 veces respecto al extracto crudo y tratamiento térmico.

Tabla 16. Tabla de purificación de YBPTI de semillas de *Capsicum annuum* L.

Paso de purificación	Cant. total proteína (mg)	Act. inhibitoria total (UIT) ^a	Act. inhibitoria específica (UIT/mg)	Pureza ^b	Rendimiento (%) ^c
Extracto crudo	7,3 ± 0,17	44,0 ± 0,05	6,03 ± 0,46	1	100
Tratamiento térmico a 100 °C	6,2 ± 0,002	39,4 ± 0,05	6,4 ± 0,43	1,06	89,5
Cromatografía de afinidad	0,11 ± 0,003	39,1 ± 0,03	355,4 ± 1,15	58,9	88,8

^a Una unidad Inhibitoria de tripsina (1 UIT) se define como la disminución en 0,01 unidades de absorbancia a 410 nm en 10 min de ensayo, a 37 °C. ^b El índice de purificación fue calculado como la relación entre la actividad inhibitoria específica en cada paso de la purificación y el la del extracto crudo tomada como 1. ^c El rendimiento fue calculado en base a la actividad inhibitoria total recuperada.

4.3. Caracterización bioquímica. Ensayos de Estabilidad. Efecto de la temperatura y pH extremos sobre la actividad de YBPTI.

El inhibidor de tripsina de morrón amarillo purificado, fue sometido a diferentes temperaturas y pHs con el objetivo de demostrar su estabilidad bajo condiciones más extremas, con el fin de ampliar el conocimiento para sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Para demostrar que la muestra de YBPTI es altamente termoestable, alícuotas de una muestra YBPTI fueron incubadas a 100 °C por 0,5, 1, 1,5, 2,5 y 3 h (Sec. 3.4.1. del Cap. 5). A su vez, otras alícuotas fueron sometidas a una incubación a pH 2 y 12 durante 30 y 60 min a 25 °C, con agitación; con el objetivo de exponer su estabilidad en estas condiciones. Luego de ambos tratamientos, se evaluó la actividad inhibitoria de tripsina residual bajo condiciones de ensayo estándar usando BApNA como sustrato y de acuerdo a lo descrito previamente en la Sec. 2.3.8. Cap. 2.

En la Figura 81 se visualizan los resultados obtenidos, para ambos tratamientos extremos. Estas pruebas se llevaron a cabo utilizando muestras de YBPTI que se liofilizaron y posteriormente se resuspendieron con agua destilada estéril, hasta llegar a obtener un contenido proteico total de YBPTI de 10 µg/mL; cuantificado a través del método de Lowry (Cap. 2 Sec. 1.2.2.).

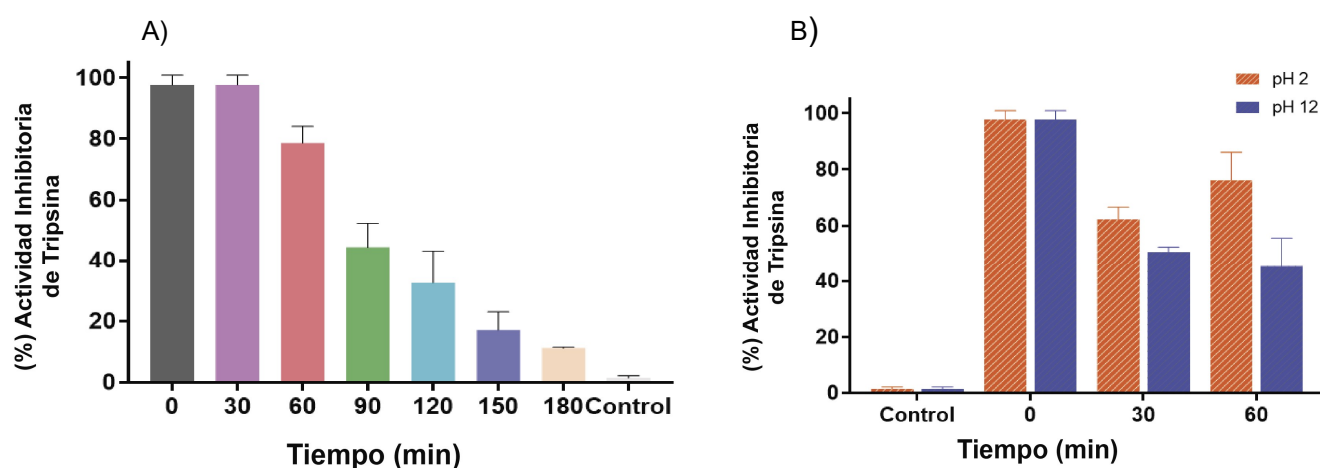


Figura 81: Estabilidad a la temperatura de 100°C (A) y pH extremos 1 y 12 (B), del inhibidor de tripsina de *C. annuum*.

Si bien la Figura 81 nos muestra que los datos obtenidos tuvieron una dispersión estándar asociada considerable, en cuanto al tratamiento térmico fue posible afirmar que, a los 30 min de exposición a 100 °C la actividad biológica residual del YBPTI fue del $99,67 \pm 5,55$ %, es decir, mantuvo casi en su totalidad su actividad inhibitoria promedio. Lo que es aún más sorprendente, es que, transcurrida una hora de exposición a esta temperatura extrema, la muestra de YBPTI mantuvo un $74,65 \pm 4,03$ % de su actividad inhibitoria de tripsina; lo cual vuelve a este inhibidor peptídico en una molécula altamente estable. A tiempos de 1,5, 2,5 y 3 h la actividad biológica residual obtenida fue del $31,74 \pm 5,49$ %, $16,24 \pm 4,33$ % y $10,67 \pm 0,20$ % respectivamente. Esto indica que aún luego de tiempos tan prolongados como 3 h de incubación a 100 °C, YBPTI aún conserva parte de su actividad inhibitoria de tripsina; comportamiento sumamente destacable, dado que esta temperatura por lo general produce una inactivación total de la actividad inhibitoria, por desnaturalización proteica a los pocos minutos de incubación. No se vio actividad inhibitoria de tripsina en el control.

Son muy pocos los reportes referidos a estabilidad térmica de proteínas a 100 °C, y mucho menos aún los referidos a estabilidad de inhibidores de proteasas a dicha temperatura. En el caso del inhibidor de tripsina de morrón amarillo, se trata de uno de los primeros estudios reportados para este tipo de moléculas, representando uno de los primeros inhibidores de tripsina altamente termoestable estudiados.

Observando la parte (B) de la Figura 81., si bien los datos también presentan una considerable desviación estándar, en cuanto a la resistencia a pHs extremos se observó que, en promedio, la actividad inhibitoria de tripsina luego de 1 hora de incubación a pH 2 fue del $69,15 \pm 10,3$ % y, en promedio, para pH 12 fue del $45,5 \pm 7,4$ %; ambos con respecto al control a tiempo 0. En conjunto, podría decirse que YBPTI conservó aproximadamente un 60 % de su actividad biológica residual luego de la incubación durante 1 h a ambos pHs. Por lo tanto, estas pruebas indicaron que YBPTI no sólo es estable a elevadas temperaturas, sino que también presenta una inusual estabilidad a pHs extremos. No se vio actividad inhibitoria de tripsina en el control.

Se pudo apreciar que solo unos pocos de los IPPs con alta estabilidad a temperaturas y pHs extremos tienen actividades biológicas. La mayoría de estos inhibidores tienen potencial utilidad como biopesticidas, con actividad inhibitoria sobre proteasas intestinales de insectos y/o inhibición del crecimiento larvario: HSTI (Aguirre et al., 2004), C11PI (Swathi et al., 2014), CFPI (Dantzger et al., 2015) y RsBBI1 (Mohanraj et al., 2018). Otras actividades biológicas informadas fueron actividad antibacteriana en *S. aureus* por LzaBBI (Martins et al., 2018) y actividad anticoagulante en la vía de coagulación extrínseca por MpBBI (Lazza et al., 2010). Aunque los IPPs de origen vegetal con alta estabilidad fisicoquímica facilitarían el almacenamiento y las condiciones de aplicación, las actividades biológicas de éstos IPPs han sido muy poco exploradas.

4.4. Actividad antioxidante.

En resultados preliminares descritos en el Cap. 2 Sec. 2.4, se había observado que los extractos de morrón amarillo, MAEC y MATT, presentaban entre un 40-60 % de actividad antioxidante. Esto sucedía cuando sus concentraciones iniciales en la muestra eran de 315 (MAEC) y 170 $\mu\text{g/mL}$ (MATT), por lo que, en condiciones de ensayo sus concentraciones finales fueron de 15,75 y 8,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Además, cuando ambas concentraciones eran de 200 $\mu\text{g/mL}$ en la muestra, es decir de 10 $\mu\text{g/mL}$ en la mezcla de reacción, las actividades antioxidantes fueron entre un 25-50 %.

Existen estudios previos que han sugerido que los inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) tienen el potencial de eliminar las especies reactivas del oxígeno (ROS, siglas en inglés para *reactive oxygen species*) y, por lo tanto, demostrar actividad antioxidante (Hou et al., 2001). Para averiguar parte de la actividad antioxidante de MAEC y de MATT pudiera estar dada por YBPTI, se realizaron los ensayos de actividad antioxidante con esta muestra. Así, se pudiera conocer si YBPTI pudiera tener participación en la inhibición de la degradación oxidativa. Por tal motivo, se procedió a realizar un experimento que utilizó al radical ABTS como sustrato (Cap. 2. Sec. 1.3.) para observar si este IPP era capaz de reaccionar con sus radicales libres.

Las muestras de YBPTI provenientes de varias cromatografías de afinidad se concentraron a través de un proceso de liofilización. Posteriormente se resuspendieron los liofilizados con agua destilada, hasta llegar a una concentración de YBPTI de 13,91 $\mu\text{g/mL}$; resultado obtenido a través del método de Lowry.

A continuación, se realizaron diluciones de la muestra concentrada y se procedió según la metodología del Cap. 2. Sec. 1.3. Los resultados de actividad antioxidante se presentan en la Figura 82., donde podemos observar que efectivamente la muestra YBPTI reacciona con el reactivo ABTS y produce una disminución bien definida de su Absorbancia a 734 nm, lo que se traduce en la Figura 87. El porcentaje de actividad antioxidante (cálculo detallado en el Cap. 2. Sec. 1.3.) se acentúa cuanto mayor es la concentración de muestra ensayada; llegando a un valor de $44,45 \pm 1,91\%$ para la máxima concentración de YBPTI, es decir, 3,478 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 82).

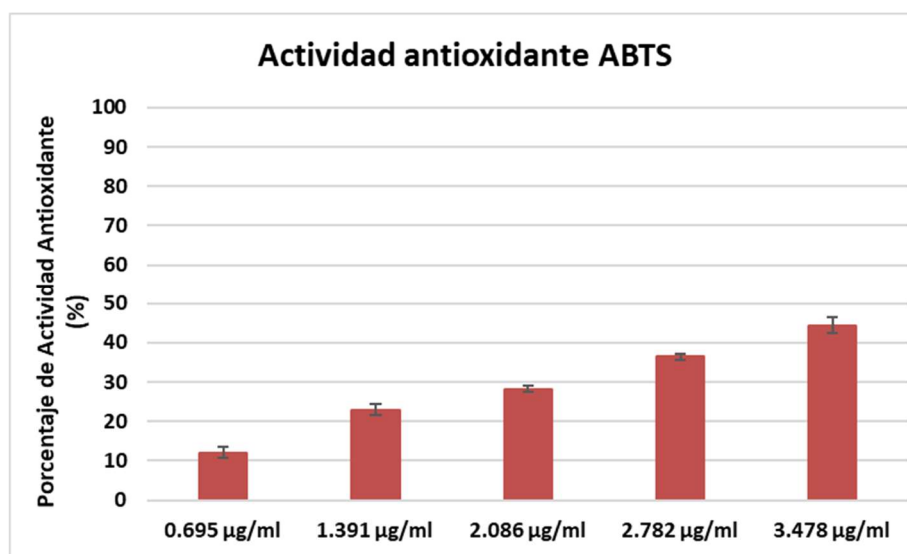


Figura 82. Actividad antioxidante de YBPTI, representada como el porcentaje de actividad antioxidante en base al control de cada concentración probada. En este gráfico de barras, dicho porcentaje fue calculado como indica la Sec. 4.6. del Cap. 3.

El resultado de YBPTI con una IC_{50} de 3,478 µg/mL resultó mejor que otros péptidos (Gg-AOPI y Gg-AOPII) de gran actividad antioxidante encontrado en semillas de *Gnetum gnemon* (Siswoyo et al., 2011), donde las IC_{50} alcanzaban los valores de 10 y 12 µg/mL, respectivamente.

Hasta la fecha no existen reportes acerca de péptidos de origen vegetal con la misma o mayor capacidad antioxidante. Sería interesante profundizar la búsqueda bibliográfica para saber si existen otros péptidos de mayor capacidad antioxidante, y de esta manera proponer a YBPTI como un potencial excelente candidato para su aplicación biotecnológica en la industria farmacéutica y/o alimentaria. De ser así, a futuro sería interesante lograr su clonado y expresión, ya que, como hemos visto, su concentración nativa es muy baja y se requiere mucha cantidad de semillas para obtener una cantidad suficiente de muestra para su comercialización.

4.5. Actividad antimicrobiana.

En el Cap. 2 Sec. 1.9., se evaluó la actividad antimicrobiana de MAEC (360 µg/mL) y de MATT (240 µg/mL) frente a diversas bacterias y a *C. albicans*; a través de la determinación del halo de inhibición de crecimiento microbiano en medio sólido (Cap. 2. Sec. 1.9).

Las especies bacterianas ensayadas fueron: *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, para las cuales no se obtuvieron resultados de inhibición. No obstante, se habían observado claros halos de inhibición al testear estos extractos frente a *C. albicans* (Cap. 2. Sec. 2.7). En la Figura 83., se observan los resultados de MAEC y de MATT, los cuales producen inhibición del crecimiento para *C. albicans* bajo las condiciones ensayadas, logrando obtener un halo de inhibición de 20 y 22 mm respectivamente.



Figura 83. Ensayo de difusión en agar para diferentes cepas de microorganismos. MATT: Tratamiento térmico a 100°C de morrón amarillo (MATT100 en el texto), MAEC: extracto crudo de morrón amarillo. Se realizó un tamizaje inicial de actividad antimicrobiana, donde no fue posible encontrar inhibición del crecimiento bacteriano a las concentraciones ensayadas; pero sí se evidenció inhibición del crecimiento de *C. albicans* a las concentraciones evaluadas.

4.6. Evaluación de la capacidad de YBPTI de inhibir el crecimiento de *Candida albicans*.

4.6.1. Cultivos en placas de agar.

Los resultados obtenidos en el Cap. 2, abrieron las posibilidades de continuar con el estudio de MAEC y MATT, para verificar si poseían actividad antifúngica sobre otras cepas de levaduras, y también para verificar si YBPTI pudiera ser responsable de parte de esa actividad biológica.

Se procedió entonces, a evaluar actividad antifúngica de los extractos empleando una concentración fija de muestra sobre diferentes especies de *Candida spp.*, *Rhodotorula spp* y sobre el hongo alimentario *Sacharomyces cerevisiae*. Este ensayo permitió evidenciar inhibición del crecimiento sobre todas las levaduras ensayadas, con diferentes halos de inhibición (Tabla 17). Para el caso de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *S. cerevisiae* pudimos apreciar la formación de una zona de inhibición mayor en el tratamiento térmico respecto al generado por el extracto crudo, lo cual concuerda con un grado de purificación mayor de la muestra donde las moléculas involucradas en la acción antifúngica presentan una

interacción más efectiva con las levaduras y pueden desarrollar su efecto inhibitorio. Sin embargo, para *C. glabrata* se evidenció una zona de inhibición mayor con el extracto crudo, dando indicio que la molécula responsable de la actividad antifúngica frente a esta cepa presenta cierto grado de inestabilidad frente al aumento de temperatura, dado que en el tratamiento térmico se observa menor efecto inhibitorio del crecimiento de *C. glabrata*.

Todas las especies de *Candida* utilizadas son patógenos humanos, *Rhodotorula spp.*, es un patógeno oportunista emergente debido al aumento de la población inmunodeprimida y *S. cerevisiae* es una levadura no patógena utilizada en la fermentación de panificados.

Tabla 17. Halos de inhibición de los Extractos MAEC y MATT frente a un grupo ampliado de levaduras.

Levaduras	Levaduras	
	MAEC	MATT
<i>Candida albicans</i> CIPROVE	20 mm	22 mm
<i>Candida tropicalis</i> CIPROVE	17 mm	19 mm
<i>Candida glabrata</i> CIPROVE	11 mm	8 mm
<i>Candida krusei</i> CIPROVE	27 mm	28 mm
<i>Rhodotorula spp</i> CIPROVE	15 mm	20 mm
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CIPROVE	21 mm	28 mm

CIPROVE: Cultivos de la colección del CIPROVE, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Para continuar con la verificación de que YBPTI es el causante principal de la actividad antifúngica evidenciada en los resultados anteriores, se evaluó su actividad antifúngica frente a las mismas cepas de levaduras.

Para ello se sembraron en una placa de cultivo (MH enriquecido con glucosa al 5 %): 5 µg de YBPTI, controles de agua y del buffer (donde no se observó inhibición del crecimiento) y discos antifúngicos de nistatina (50 µg) y fluconazol (25 µg), como controles de inhibición. Estos discos sirven para evaluar sensibilidad, es decir, para corroborar que al menos uno de ellos produce inhibición del crecimiento de las levaduras; generando un halo cuantificable, que sirve de referencia para la comparación con el halo de inhibición que produce YBPTI. Por otro

lado, ambos antifúngicos son de naturaleza química diferente, permitiendo también dos parámetros diferentes de comparación.

En el caso de los controles negativos, se sembraron una gota de agua destilada estéril y un control correspondiente a una gota de buffer fosfato 0,01 M, pH 7,4, para cerciorar, por un lado, que la muestra no produzca un lavado sobre la pátina de las levaduras y, por el otro, que la inhibición del crecimiento no fuese dada por la presencia de sales en la muestra YBPTI.

De esta manera, para 5 µg de YBPTI pudimos evidenciar inhibición del crecimiento para *C. albicans* (Figura 89. A) y para *S. cerevisiae* (Figura 84. F), con un halo de 10 mm en ambos casos, pero no fue posible evidenciar efecto inhibitorio del crecimiento de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Rhodotorula spp* y *S. cerevisiae* 84. B. C. D y E).

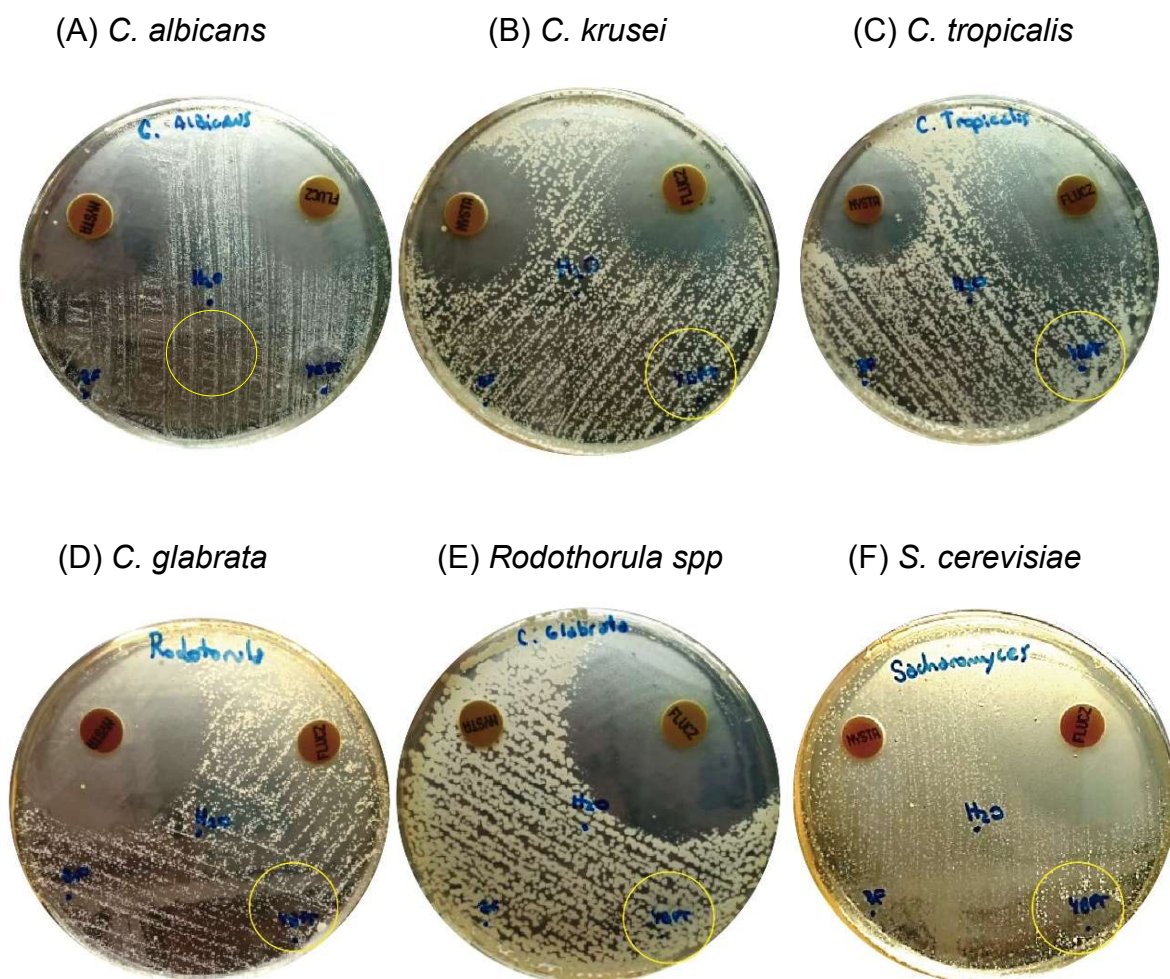


Figura 84: Ensayo de difusión en agar para diferentes cepas de levaduras. CIPROVE: Colección de cultivos del CIPROVE, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Los discos FLUCZ y NYSTA corresponden a los antifúngicos fluconazol y nistatina respectivamente. Otros controles sembrados fueron agua estéril (H₂O) y buffer fosfato 0,01M pH 7,4 (BF). Los círculos amarillos indican donde fue sembrada la muestra de YBPTI.

Se evidenció inhibición de YBPTI sobre *C. albicans* y también sobre el hongo alimentario *S. cerevisiae*. Pero debido a que *C. albicans* es un patógeno de gran importancia en el ámbito clínico y que en los últimos tiempos se ha vuelto cada vez más resistente a los antifúngicos conocidos; se decidió profundizar el estudio de la actividad inhibitoria de YBPTI sobre este último microorganismo.

Para corroborar el resultado, se repitió el ensayo anterior de difusión en agar, pero únicamente para *C. albicans* y con una concentración de YBPTI más concentrada. Para ello, se sembraron 315 μ l (en pequeñas gotas) de YBPTI 221,3 μ g/mL (66 μ g totales). Asimismo, se realizó un control salino, empleando una solución de NaCl concentrado (420 mM), que representa el mismo grado de concentración que tuvo la muestra de YBPTI, ya que esta fue concentrada pero no desalada.

La Figura 85 exhibe los resultados obtenidos luego del período de incubación. En la misma se observa que se produjo únicamente un halo de inhibición de 21 mm para YBPTI, no así para el control NaCl 420 mM. Es importante remarcar que estos resultados son consistentes con los obtenidos en los ensayos de difusión anteriores y permiten concluir que el inhibidor de tripsina purificado es capaz de inhibir el crecimiento de la levadura patógena, al menos en las condiciones ensayadas en este trabajo.

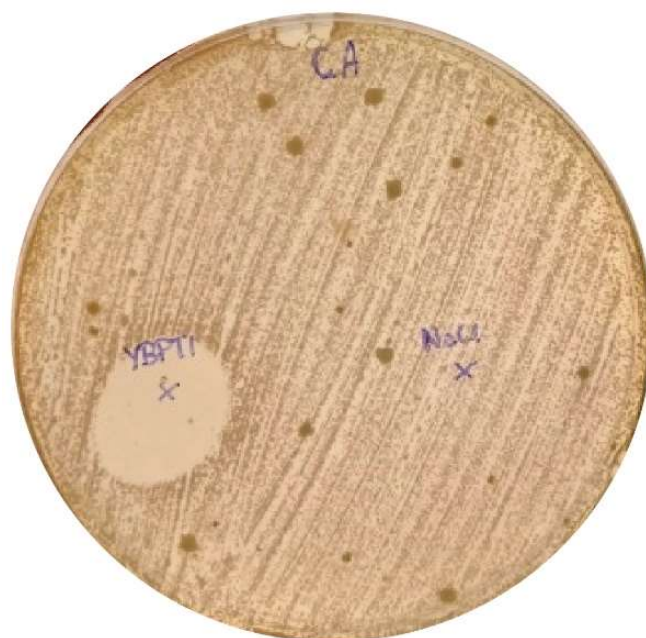


Figura 85. Ensayo de difusión en agar para la levadura *C. albicans*, inóculo obtenido a partir del stock de la colección de cultivos del CIPROVE, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

4.6.2. Cultivos en medio líquido.

Finalmente, para evaluar en conjunto el efecto del extracto crudo, tratamiento térmico e YBPTI sobre el crecimiento *C. albicans*, se llevó a cabo un experimento de actividad antifúngica en caldo. Se emplearon diluciones seriadas en caldo MH. Estas diluciones se realizaron mediante el agregado de concentraciones crecientes de muestra, en un esquema similar de trabajo al que se describe en la Sec. 1.8.2. del Cap. 2., para bacterias. En este caso, la suspensión de levadura se normalizó al 0.3 en la escala de Mc Farland y las concentraciones de muestra utilizadas, abarcaron el rango de 1653,1 µg/mL y 2,3 µg/mL para el extracto crudo, de 687,6 µg/mL y 0,9 µg/mL para el tratamiento térmico y de 51,1 µg/mL y 0,07 µg/mL para el YBPTI. De este modo fue posible determinar una CIM de 61,2 µg/mL para MAEC y 25,5 µg/mL para MATT, mientras que concentraciones de 183,7 µg/mL para MAEC y 76,4 µg/mL para MATT produjeron inhibición completa (CFM, Concentración Fungicida Mínima) luego de 20 horas de incubación.

En el caso del YBPTI se logró evidenciar una CIM de 5,7 µg/mL con inhibición completa (CFM) a concentraciones de 17,03 µg/mL.

Tal como se describió en el Cap. 2. Sec. 2.6.2., los cálculos de CIM y de CBM (CFM en este caso) pueden establecerse en cultivos en medios líquidos de tal manera que la última dilución de antimicrobiano en la que no se observe crecimiento a simple vista nos dará el valor de CIM. Por otro lado, sembrando en medio de cultivo sólido todas las diluciones sin crecimiento, la última dilución que no presente crecimiento nos dará el valor de CFM.

De los datos obtenidos se extrae que, para producir el mismo efecto inhibitorio que MAEC y que MATT, se requiere una concentración de YBPTI aproximadamente 10 y 5 veces menor respectivamente. Para el caso del control positivo con el antifúngico comercial fluconazol, se vio que la concentración inhibitoria mínima para *C. albicans* fue de 3.5 µg/mL lo que indica que el valor obtenido para YBPTI (5,7 µg/mL) se encuentra dentro del rango de uno de los antifúngicos sintéticos más utilizados para combatir la infección por este patógeno. Este hallazgo es sumamente importante ya que promueve al inhibidor de tripsina YBPTI de *C. annuum*, como una molécula capaz de llegar a ser un potencial fármaco natural contra la infección causada por *C. albicans*, muy eficiente y potente a muy bajas concentraciones, del rango del antifúngico sintético comercial más utilizado en la actualidad.

Estos resultados reafirman lo dicho anteriormente sobre lo interesante e importante que sería poder clonar y expresar en grandes cantidades esta molécula.

4.6.3. Análisis por microscopía óptica y evaluación de viabilidad por absorción de SYTOX Green.

Para continuar profundizando los estudios de los efectos del YBPTI sobre *C. albicans* se realizó un análisis morfológico por microscopía óptica. En un primer ensayo (tubo de control, A), se incubó una cepa de *C. albicans* en un medio de cultivo a 37°C durante 20hs. En paralelo y en similares condiciones, en otro tubo (tubo de muestra, B), se incubó la misma cepa, pero con el agregado del inhibidor YBPTI en el medio de cultivo. Pasado este tiempo se realizaron extendidos sobre portaobjetos, para poder realizar observaciones al microscopio óptico normal.

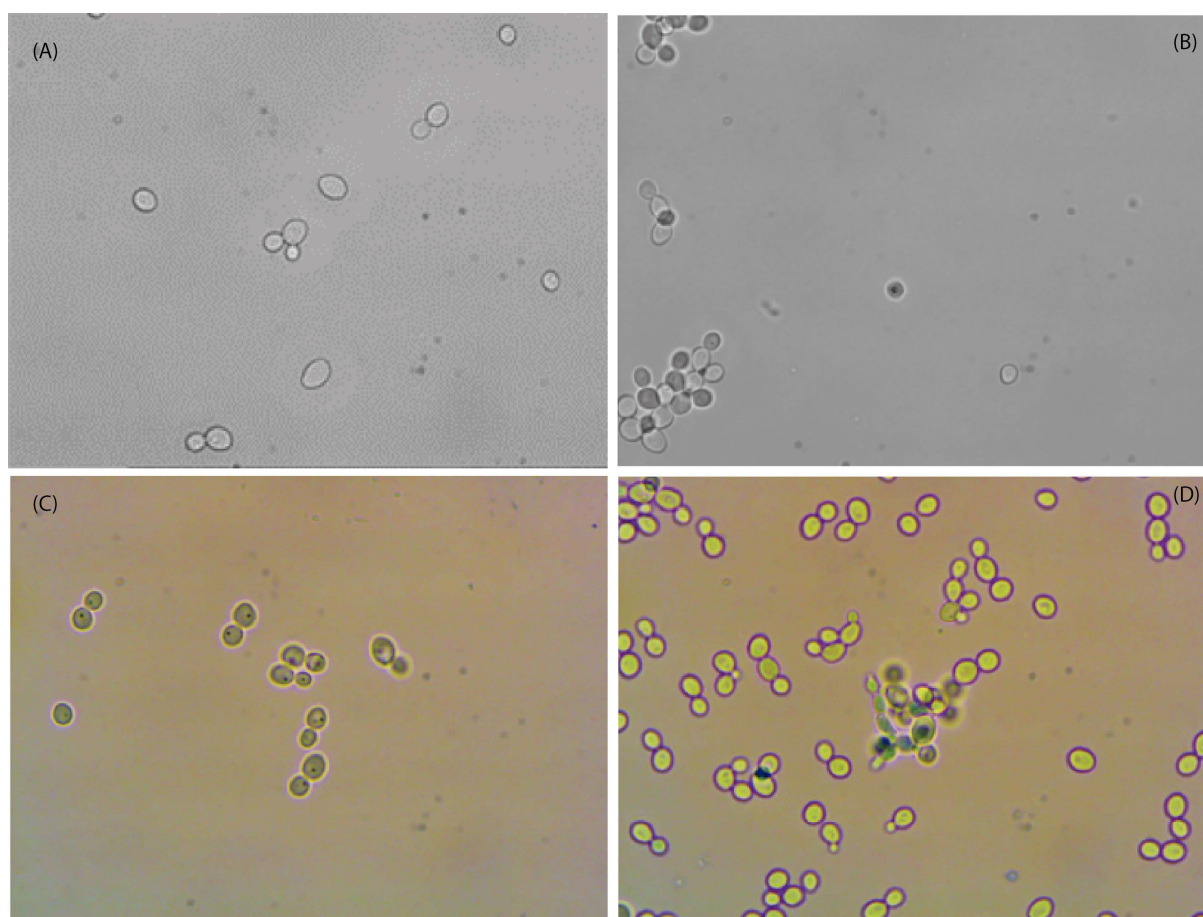


Figura 86. Análisis por microscopía óptica de morfología y viabilidad, después de 20 horas de incubación del ensayo de inhibición del crecimiento de *C. albicans*. **(A)** se observan las levaduras control, sin agregado de YBPTI. **(B)** las levaduras luego de la incubación con YBPTI en el medio. **(C)** se observan las levaduras control, sin agregado de YBPTI, a las que se les realizó una tinción con azul de metileno. **(D)** las levaduras luego de la incubación con YBPTI en el medio, a las que se le realizó la tinción de azul de metileno. Se evidenció la presencia de células aglomeradas y oscuras (B y D) en presencia de YBPTI.

Mediante observación directa se evidenció la presencia de células aglomeradas, oscurecidas y algunas más compactadas. (Fig. 86B) del tubo B; a diferencia de las células control, que mostraron crecimiento y morfología normal (Fig. 86A), del tubo A. Asimismo, se pudo confirmar el resultado anterior al realizar la observación sobre estos mismos extendidos, pero aplicando la tinción vital de azul de metileno.

Aquí se observó que en presencia de YBPTI (Tubo B) aparecieron células aglomeradas azuladas, es decir, muertas ya que no son capaces de expulsar el colorante (Fig. 86D), a diferencia de las células control (Tubo A) que no se muestran coloreadas (Fig. 86C).

También, mediante el ensayo de microscopia de fluorescencia con *SYTOX GREEN*, se pudo evidenciar el daño de membrana, con su consecuente pérdida de viabilidad celular en presencia de YBPTI. Esto se visualiza claramente porque el reactivo *SYTOX Green* no atraviesa membranas intactas, pero penetra fácilmente a través de las membranas con su estructura comprometida, lo que es una de las características de las células muertas.

En la Fig. 87E se observa el extendido proveniente del tubo B, en presencia de YBPTI y de *SYTOX Green*, pero sin aplicar fluorescencia, solo con luz visible; y en la Fig. 87F se observa la misma muestra, en el mismo campo, pero con aplicación de fluorescencia. De esta manera, en la fotografía de la Fig. 87E se observan algunas levaduras “enteras” pero que al ser visualizadas por fluorescencia (Fig. 87F) se tiñen de color verde intenso. Esto puede significar que, a la concentración ensayada, el YBPTI es capaz de generar un perjuicio en la membrana de la levadura, observable por la presencia de *SYTOX Green* en el interior de la célula, pero no visualizable con luz visible.

Para realizar un control negativo de la tinción, se utilizó un extendido generado a partir de un cultivo de la misma cepa de levadura, pero esta vez sin tener contacto con el YBPTI. En la Fig. 87G, se evidencia la presencia de levaduras en el campo seleccionado, pero al cambiarse a las condiciones de fluorescencia, (Fig. 87H), no se puede visualizar la emisión del colorante en su reacción específica con los ácidos nucleicos.

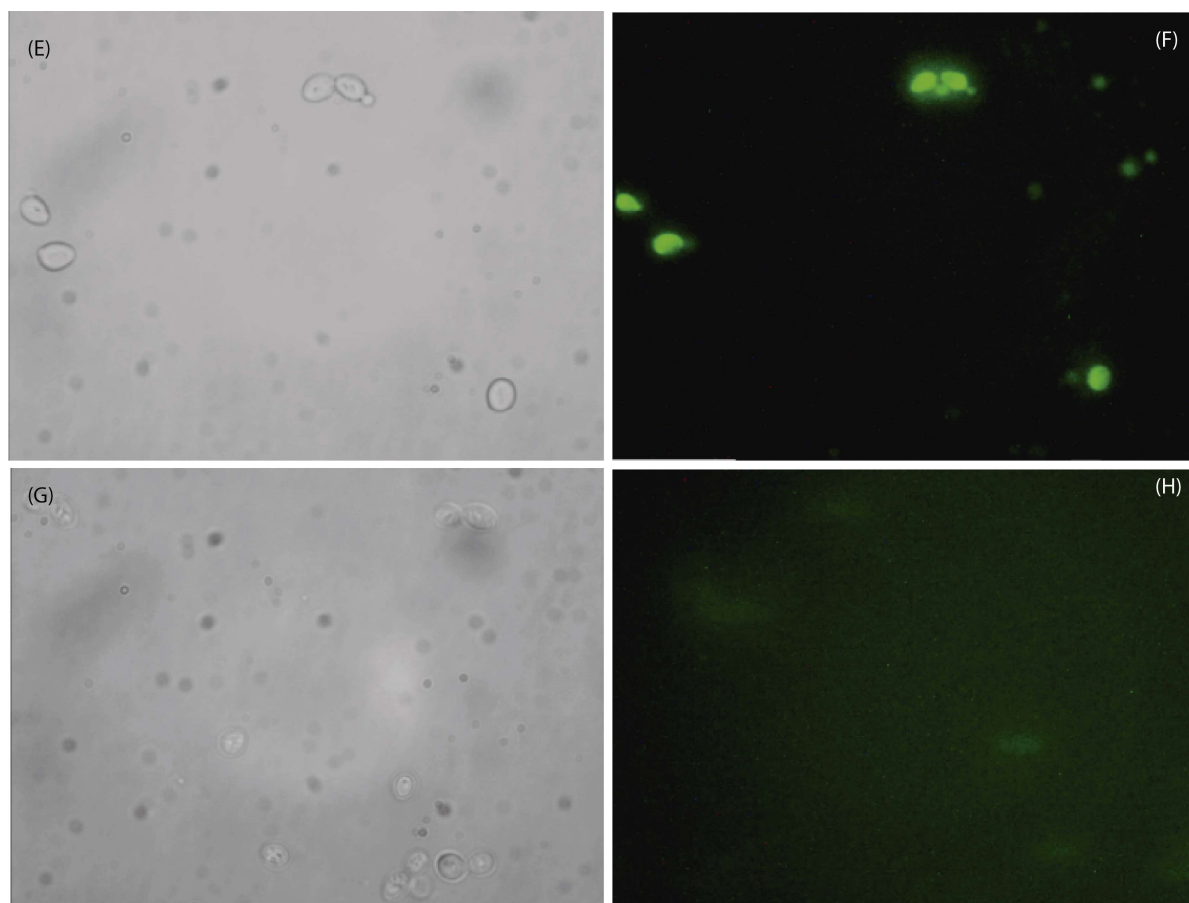


Figura 87. Análisis por microscopía óptica de morfología y viabilidad, después de 20 horas de incubación del ensayo de inhibición del crecimiento de *C. albicans*. **(G)** se observan las levaduras control, luego de la incubación con YBPTI, teñidas con Sytox Green observadas en modo óptico **(F)** las levaduras luego de la incubación con YBPTI en el medio, teñidas con Sytox Green observadas por lectura en modo de Fluorescencia. **(G)** se observan las levaduras control, sin agregado de YBPTI, observadas en modo óptico. **(D)** las levaduras sin agregado de YBPTI en el medio, observadas por lectura en modo de Fluorescencia.

Los ensayos con SYTOX Green resultaron en una fluorescencia verde brillante por parte de las levaduras tratadas con YBPTI (Fig. 87F). Las Figs. 87E y 87G representan un control de fluorescencia realizado para verificar que la falta de fluorescencia se deba a que efectivamente no pudo penetrar SYTOX Green, y no a la falta de levaduras en el campo.

Los experimentos anteriores mostraron que YBPTI, resultó ser un inhibidor de Tripsina con actividad anti fúngica. Una explicación de ello, podría radicar en la posible inhibición de proteasas fúngicas. Es sabido que muchos hongos fitopatógenos producen proteasas extracelulares (Kalashnikova et al., 2003) que pueden desempeñar un papel activo en el desarrollo de enfermedades causadas por ellos (Sara & Heale, 1990). La virulencia y el crecimiento óptimo de los hongos dependen de varias proteasas extracelulares secretadas,

entre las cuales las serín proteasas, son de particular interés. Este sistema proteolítico permite que los hongos sobrevivan y penetren en los tejidos (Burchacka et al., 2021).

Se conoce que las plantas pueden secretar inhibidores de proteasas cuando son expuestas a organismos patógenos (bacterias, hongos, insectos) que tienen como uno de sus principales agentes patogénicos a las proteasas; fenómeno que fue registrado por primera vez en tomates infectados con *Phytophthora infestans* (Woloshuk et al., 1991) donde el aumento de los niveles de inhibidores de tripsina se correlacionó con la resistencia de la planta y los niveles de tripsina con la expresión del patógeno.

Por otro lado, estudios realizados sobre otras variedades de *Capsicum annuum*, también han demostrado poseer inhibidores peptídicos con actividad antifúngica dada por su capacidad permeabilizante de membrana plasmática (Diz et al., 2006); lo cual se asoció a un mecanismo de defensa presente en las semillas. Sin embargo, aún no se han identificado dichos péptidos, con lo cual es altamente probable que YBPTI sea uno de ellos.

De esta manera, uno de los posibles mecanismos por el cual YBPTI podría estar actuando, sería a través de la inhibición de tales proteasas extracelulares. Dado el papel de las proteasas fúngicas durante la infección, cualquier molécula capaz de inhibir selectiva y específicamente su actividad puede conducir al desarrollo de fármacos potenciales. Debido a su modo de acción específico, los inhibidores de la proteasa fúngica podrían evitar que se produzca la resistencia observada con los tratamientos actualmente disponibles (Burchacka et al., 2021). De ser esto así, nos encontraríamos frente a un posible nuevo fármaco natural que, a muy bajas concentraciones, sería capaz de inhibir el proceso infeccioso de *C. albicans*.

Sin embargo, aunque las proteasas secretadas por hongos han sido ampliamente estudiadas como posibles factores de virulencia, nuestra comprensión de la especificidad de sustrato de tales proteasas sigue siendo bastante limitada. Por esta razón debe seguir profundizándose el estudio acerca del mecanismo de inhibición de crecimiento sobre *Cándidas* para obtener una aproximación más certera de cómo funciona este IPP sobre la levadura.

4.7. Actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

A pesar de que en el tamizaje de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa sobre el extracto crudo (MAEC) y tratamiento térmico (MATT) de morrón amarillo no presentaron actividad inhibitoria sobre dicha enzima, se decidió realizar el ensayo sobre la fracción YBPTI, ya que, por un lado, en los capítulos anteriores se había observado dicha actividad en GdTI, otro inhibidor de serín proteasa; y por otro lado, porque sería interesante encontrar dicha actividad en una molécula que además posea actividad anticándidas, por lo que se expresará a continuación:

Entre los grupos de riesgo que son más susceptibles a una infección por *Candida spp.* se encuentran los pacientes con diabetes mellitus (DM) (Mohammed et al., 2021) cuyas infecciones son agravadas en casos de hiperglucemia no controlada (Rodríguez et al., 2019). Para estos pacientes, los períodos de hospitalización se han incrementado, lo que también aumenta los costos asociados con el manejo de la enfermedad. Se han atribuido múltiples mecanismos por los cuales los pacientes con DM presentan mayor predisposición a una infección por *Candida spp.*, entre ellas la adhesión de la levadura a la superficie de las células epiteliales, los niveles más altos de glucosa salival, el flujo salival reducido, la degeneración microvascular y la actividad candidiácica alterada de los neutrófilos. Estas condiciones son particularmente graves en presencia de glucosa, secreción de varias enzimas degradativas o incluso en un estado de inmunosupresión generalizada. Es por ello que la regulación de los niveles de glucosa en sangre representa un factor a tener en cuenta para la prevención de la infección por *Candida spp.* En este sentido, en esta sección del capítulo se reporta la acción hipoglucemiante de YBPTI mediante su efecto inhibitorio de la enzima α -1,4-glucosidasa, otorgando a esta biomolécula doble acción biológica (inhibición del crecimiento de *C. albicans* e inhibición de la enzima α -glucosidasa), información interesante para su potencial aplicación terapéutica en estos grupos de riesgo.

Por tal motivo, para la evaluación de la actividad inhibitoria, se prepararon muestras de YBPTI, obtenidas por cromatografía de afinidad y se las concentró a través de un proceso de liofilización. Posteriormente se pasó a re suspender estos liofilizados con agua destilada, hasta llegar a una concentración de YBPTI de $10,34 \pm 0,00094 \mu\text{g/mL}$; cuantificada.

Se realizó una curva dosis respuesta a partir de la cual se determinó el parámetro cinético, IC_{50} , es decir, la concentración a la cual se produce una inhibición del 50% en la

actividad enzimática (Fig. 88). Esto se logró midiendo la actividad inhibitoria de la muestra a distintas concentraciones proteicas y se demostró que YBPTI inhibe la enzima α -glucosidasa con un valor de IC_{50} de 75,33 ng/mL.

Estos valores resultaron sorprendentes, no solo por la demostración de actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa por parte de YBPTI sino porque además el valor fue muy por debajo del obtenido para GdTI, con un valor de 1,21 μ g/mL.

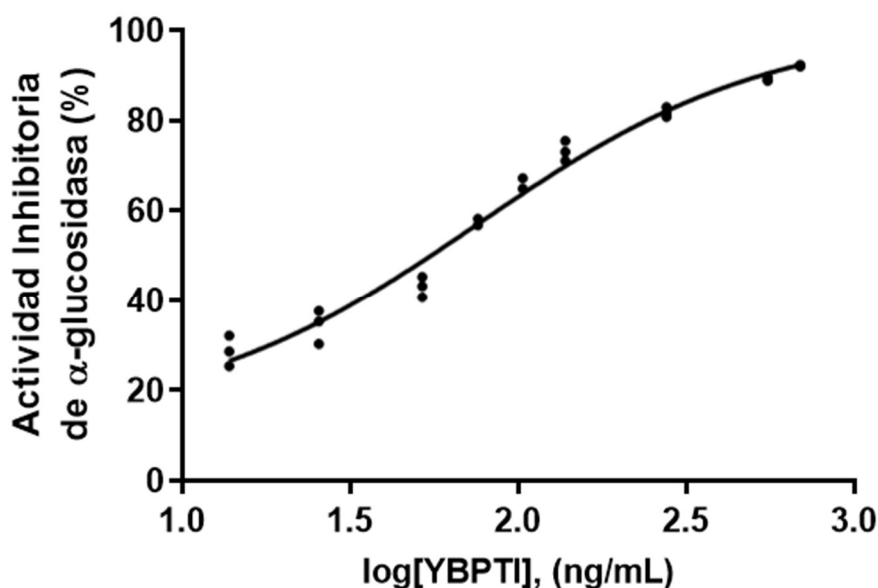


Figura 88: Actividad inhibitoria contra α -glucosidasa representada como porcentaje de inhibición, en función del logaritmo en base 10 de la concentración del inhibidor de tripsina de *C. annuum* L.

Por tal motivo, de acuerdo con los resultados obtenidos, es posible observar que YBPTI es responsable de inhibir fuertemente a la enzima α -glucosidasa y esto no es producto de las sales de presentes en la muestra, dado que el control NaCl 25 mM no presentó inhibición.

Además, nuevamente, al igual que con GdTI, se descubre actividad inhibitoria de α -glucosidasa en una fracción con actividad inhibitoria de proteasas. Queda pendiente evaluar a través de que mecanismo tanto GdTI como YBPTI inhiben a la enzima α -glucosidasa y ejercen su efecto hipoglucemiante. De esta manera, YBPTI sería capaz de tener efectos directos en la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Este efecto sumado a la capacidad antioxidante y antifúngica demostrada previamente por este inhibidor, lo convierte

en una molécula con gran potencial para el desarrollo de una droga natural antidiabética, antifúngica y antioxidante.

4.8. Ensayos de citotoxicidad celular de YBPTI.

Finalmente se realizaron ensayos de citotoxicidad celular utilizando el rango de concentraciones donde YBPTI inhibió el crecimiento de *C. albicans*, ya sea con una CIM de 5,7 $\mu\text{g/mL}$ o con inhibición completa a concentraciones de 17,03 $\mu\text{g/mL}$ (CFM). En este caso las concentraciones utilizadas fueron desde 0,15 $\mu\text{g/mL}$ hasta 40 $\mu\text{g/mL}$. De acuerdo a lo observado en la curva, un valor de alrededor de 5 $\mu\text{g/mL}$ mantendría casi un 90 % de viabilidad celular mientras que un valor de 15 $\mu\text{g/mL}$ conservaría cerca de un 85% de viabilidad celular. También es observable que incluso a una concentración más del doble de la CFM (17,03 $\mu\text{g/mL}$), es decir 40 $\mu\text{g/mL}$, se mantiene un 80% de viabilidad celular (Fig. 94). Se sabe que para estos ensayos es aceptable hasta un 75% de viabilidad celular para predecir inocuidad en un compuesto que tiene potencialidad terapéutica (León et al., 2006; Escobar et al., 2010).

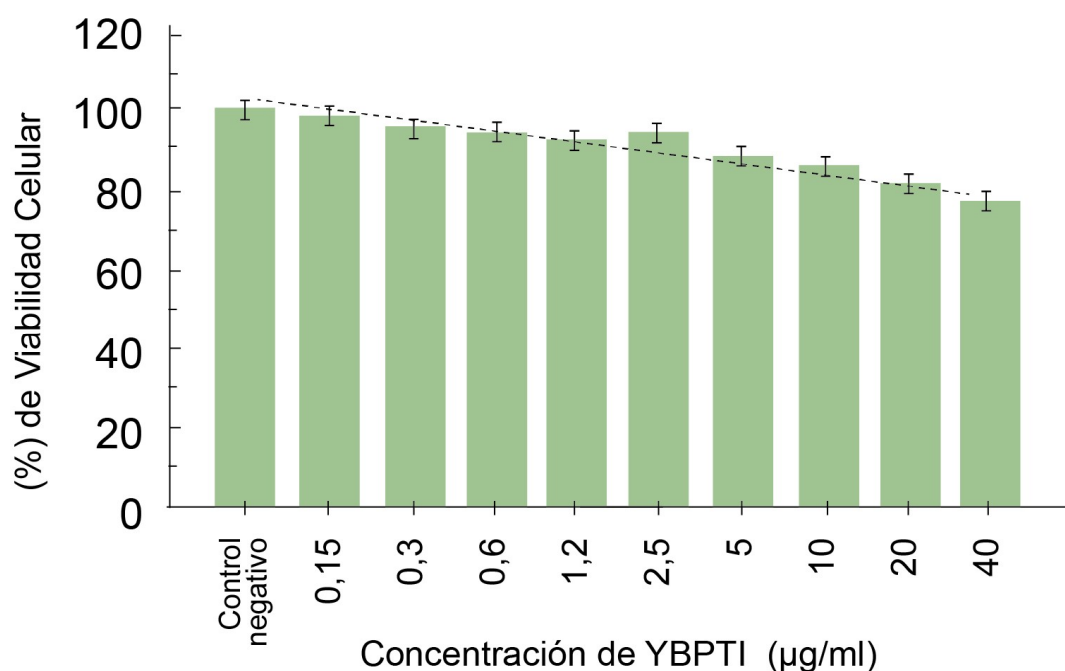


Figura 89: Se observa el (%) de viabilidad celular a diferentes concentraciones de YBPTI ($\mu\text{g/mL}$).

Siguiendo el análisis de la curva de citotoxicidad se puede realizar una extrapolación y encontrar un dato hipotético de la dosis letal 50 teórica (DL_{50}), el cual sería de 95,23 $\mu\text{g} / \text{mL}$, valor casi 5 mayor que la CFM.

Por lo pronto, YBPTI se posiciona como un prometedor fármaco natural para la potencial aplicación de este inhibidor como agente anti-cándida.

5. Conclusiones de este capítulo

En este capítulo se reporta el estudio de un inhibidor de proteasa de tripsina multifuncional (YBPTI) obtenido a partir de semillas de pimiento amarillo. YBPTI no solo presenta actividad inhibitoria de serin proteasas, sino que también presenta actividad antioxidante, antifúngica e inhibitoria de la enzima α -glucosidasa. Todas estas propiedades convierten a YBPTI es una molécula versátil con potenciales acciones en enfermedades cardiovasculares y metabólicas por su capacidad antioxidante e hipoglucemiante. Por otro lado, YBPTI puede ser un potencial agente natural con capacidad de inhibición del crecimiento de diferentes especies del género *Candida*.

Resumen de conclusiones específicas:

- Se obtuvo un extracto crudo denominado MAEC ($162,46 \pm 0,17 \mu\text{g} / \text{mL}$), con actividad inhibitoria de tripsina con un valor de inhibición de $98,20 \pm 0,44\%$.
- Se obtuvo un tratamiento térmico (MATT) con una concentración proteica total fue de $155,14 \text{ g} / \text{mL}$ y un porcentaje de inhibición de tripsina de $97,34 \pm 0,95\%$.
- Se purificó un inhibidor (YBPTI) mediante una cromatografía de afinidad a partir del extracto MATT en una matriz conteniendo tripsina inmovilizada en glioxil agarosa.
- YBPTI presentó una IC_{50} de $3,9 \mu\text{g}/\text{mL}$, y K_i de $1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$.
- YBPTI mantuvo un $99,67 \pm 5,55\%$ de actividad biológica residual luego de 30 minutos de exposición a 100°C .
- YBPTI presenta actividad antioxidante con un valor de $44,45 \pm 1,91\%$ para una concentración de $3,478 \mu\text{g}/\text{mL}$ del inhibidor.
- YBPTI ($5 \mu\text{g}$ totales) presenta inhibición del crecimiento para *C. albicans* y para *S. cerevisiae*, con un halo de 10 mm en ambos casos, pero no fue posible evidenciar efecto inhibitorio del crecimiento de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Rhodotorula spp* y *S. cerevisiae*.
- También se demostró que YBPTI inhibe fuertemente a la enzima α -glucosidasa con un valor de IC_{50} de $75,33 \text{ ng} / \text{mL}$.
- En las pruebas de citotoxicidad de YBPTI se pudo observar que a una concentración más del doble de la CFM ($17,03 \mu\text{g} / \text{mL}$), es decir $40 \mu\text{g} / \text{mL}$, se mantiene un 80% de viabilidad celular.

CAPÍTULO 6

**Aislamiento y purificación de fracciones
peptídicas con propiedades antioxidantes a partir
de semillas de *Geoffroea decorticans*.**

1. Introducción

En los últimos años, la búsqueda de compuestos bioactivos con aplicación en la industria biomédica o agroalimentaria se ha visto incrementada debido a la necesidad de implementar más productos naturales en reemplazo de compuestos producidos por síntesis química. De esta forma, la comunidad científica busca dar respuesta a las consecuencias del uso de compuestos sintéticos, que pueden estar directamente relacionados con efectos secundarios no deseados, toxicidad residual y mayores costos de producción, entre otros. En este sentido, las plantas representan una rica fuente de compuestos bioactivos que podrían ser candidatos potenciales para su purificación y uso en las áreas antes mencionadas.

La identificación de nuevos compuestos anticoagulantes de fuentes naturales ha ganado interés debido a su aplicación directa en el tratamiento de ECV y otras enfermedades asociadas, como infecciones virales (Franchini et al., 2020), cáncer (Bang et al., 2020), malaria (Adewole et al., 2017), hipertensión (Herrera Chale et al., 2014; Indiano-Romacho et al., 2019), y/o trastornos de la sangre (Sun et al., 2019). Por otro lado, se ha demostrado previamente que las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel vital en el desarrollo y la progresión de las ECV (Bilska et al., 2006; Ngo et al., 2011; Valko et al., 2007; Victor et al., 2007). De hecho, la generación de ROS y radicales libres tiene efectos nocivos en muchas moléculas del cuerpo humano, como el ADN, los ácidos grasos y las proteínas (Sivonova et al., 2007). Por lo general, las proteínas y los péptidos pueden inhibir las reacciones oxidativas, en parte debido a su capacidad para neutralizar los efectos de los metales de transición, lo que lleva a la formación de complejos metálicos insolubles menos reactivos (Diaz et al., 2003). Estudios recientes han demostrado que las proteínas crudas de algunas de las semillas de especies de plantas como el guisante (Ndiaye et al., 2012), el garbanzo (Torres-Fuentes et al., 2015) y los granos de maní (Hwang et al., 2010) muestran una fuerte actividad antioxidante asociada con perfiles de baja toxicidad (Girjal et al., 2012).

Se ha identificado un número creciente de péptidos bioactivos de diversas fuentes de plantas medicinales (Hong et al., 2014; Ningappa et al., 2008; Siswoyo et al., 2014; Srivastava et al., 2012). Sin embargo, ya habíamos dicho que la composición proteica y la actividad de los compuestos bioactivos presentes en la planta de *G. decorticans* (chañar) han sido pobremente caracterizados. Como citáramos anteriormente, *G. decorticans* es una especie nativa de Sudamérica que es reconocida por sus propiedades medicinales. Sin embargo, se dispone de pocos informes de moléculas bioactivas aisladas de esta fuente vegetal y hasta la fecha solo se ha purificado la proteína GdTI, descrita en el capítulo 4.

2. Objetivos de este capítulo.

De acuerdo a lo estudiado en el capítulo 4, GdTI presenta escasa actividad antioxidante. Siguiendo esta premisa, y según los resultados obtenidos para GdEC (aprox. 100%) y GdTT (aprox. 100%), informados en el capítulo 4, se observa una elevada actividad antioxidante para estas muestras, siendo los extractos de mayor contenido en biomoléculas con esta propiedad. Por este motivo, se plantea en esta nueva línea de trabajo de tesis doctoral, el posible aislamiento y caracterización de fracciones peptídicas provenientes de GdTT que mantengan actividad antioxidante, aprovechando las estrategias de purificaciones aplicadas para GdTI.

- Purificar parcialmente y caracterizar la fracción proteica (GdAPs) con actividad antioxidante proveniente de GdTT, aplicando estrategias de tratamiento térmico y cromatografía de exclusión molecular
- Analizar por espectrometría de masas con MALDI-TOF/MS los péptidos pertenecientes a GdAPs.
- Investigar y cuantificar la actividad antioxidante de GdAPs.
- Investigar el efecto de GdAPs sobre la actividad anticoagulante *in vitro* en ambas vías de la coagulación.

3. Metodología.

3.1. Aislamiento por tratamiento térmico y análisis densitográfico.

El extracto crudo (GdEC) se sometió a un baño de agua a 90 °C durante 30 min. Después de enfriar la muestra, las proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación a 4 °C durante 30 min a 7000 × g. Después de la centrifugación, se determinó el contenido de proteína soluble y la actividad antioxidante del extracto crudo no tratado y la muestra tratada térmicamente (GdTT). Se utilizó el análisis SDS PAGE para determinar el perfil de proteínas durante los diferentes pasos de purificación. Los geles se tiñeron con plata siguiendo el protocolo de Chevallet, Luche y Rabilloud (Chevallet et al., 2006). Se produjeron densitogramas para cada carril usando el programa GelAnalyzer 19.1. Los picos obtenidos se compararon de acuerdo con los valores de R_f (factor de retardo) calculados y la intensidad de la banda, que es proporcional a la concentración de proteína en cada pico.

3.2. Cromatografía de exclusión molecular.

Se cargó una alícuota de 1 mL de GdTT (1767 µg / mL) en una columna Sephacryl S100 HR (1,5 × 40 cm) conectada a un purificador Äkta (GE Healthcare) previamente equilibrado con agua milliQ. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente isocrático y un caudal de 0,8 mL/min. Durante la elución, la absorbancia se controló continuamente a 280 y 215 nm. Se determinó la actividad antioxidante para cada fracción, y se seleccionó la fracción con mayor actividad antioxidante para su posterior análisis.

3.3. Determinación por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS.

Se procedió según la metodología de las Secs 4.5. y 4.6. del Cap. 4.

Se realizó el análisis PMF para la identificación de los péptidos antioxidantes de Chañar. Primero, se realizó una digestión trípica *in situ* de las bandas proteicas cortadas de la electroforesis Tris-tricine SDS-PAGE, siguiendo un protocolo PMF estándar (Obregón et al., 2009). A continuación, los péptidos trípticos se disolvieron en 10 µl de CF₃CO₂H (ácido trifluoroacético) al 0,1 % (v/v) y se analizaron mediante MALDI-TOF en presencia de una matriz HCCA. Los espectros de masas de los péptidos trípticos se adquirieron usando un espectrómetro de masas Bruker Daltonics Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics) en un modo positivo de reflectrón que funciona a un voltaje de aceleración de 25 kV. En ambos casos, se usó como referencia una mezcla estándar de calibración de péptidos de Bruker Daltonics.

Cuatro iones precursores MH⁺ (1267.672, 1682.694, 1925.806 y 2778.353) se sometieron a fragmentación TOF-TOF. Los espectros de fragmentación resultantes para estos iones MH⁺ precursores se compararon con todos los patrones de fragmentación para todas las secuencias presentes en la base de datos MASCOT, considerando la carbamidometilación de todas las Cys (www.matrixscience.com, acceso el 1 de abril de 2020). Todos los experimentos de MS se realizaron en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM de la Universidad de Buenos Aires/CONICET.

3.4. Actividad antioxidante.

Se procedió según la metodología de Sec. 1.6. Cap. 2. y Sec. 2.5. del Cap.3.

3.5. Actividad anticoagulante.

Se utilizó la metodología de Sec. 2.4. del Cap. 3.

Para la prueba de PT se utilizó el reactivo comercial Soluplastin (Wiener Lab). Para realizar las reacciones se incubaron partes iguales de la muestra ppp y GdAPs (0-215 $\mu\text{g} / \text{mL}$) durante 2 min a 37 °C. Posteriormente se adicionó 50 μL de Soluplastin a 25 μL de la mezcla y se evaluó la muestra para determinar el tiempo de coagulación. Para la prueba de TTPa se añadieron 25 μL de TTPa (Wiener Lab) a igual volumen de mezcla ppp-GdAPs (previamente incubada 2 min a 37 °C). Después de una incubación de 2 min a 37 °C, se añadieron a las muestras 25 μL de CaCl_2 50 mM. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

3.6 Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos (ANOVA) se realizaron con el software GraphPad Prism v. 01 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>, acceso el 10 de junio de 2021). Se utilizó una prueba post hoc de Tukey ($p < 0,05$) para identificar diferencias significativas entre las medias de los diferentes grupos analizados.

4. Resultados y discusiones.

4.1. Obtención y caracterización de los extractos.

El extracto crudo de las semillas de chañar (GdEC) tiene una concentración de proteína de 1069 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este extracto se sometió a un tratamiento térmico (GdTT), que tenía una concentración de proteína menor que el extracto crudo (489 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La Fig. 90 muestra el análisis mediante densitograma del perfil electroforético de las proteínas presentes inicialmente en el extracto crudo y las que quedan remanente luego del tratamiento térmico. Este análisis reveló que el tratamiento térmico produce una eliminación de proteínas termolábiles, las cuales poseen en su mayoría masas moleculares superiores a 20 kDa. Estos resultados están en concordancia con los valores de concentración obtenidos por el ensayo de Bradford. Así, la incubación del extracto crudo a altas temperaturas generó un producto clarificado y mejor adecuado para los siguientes pasos de purificación. Así, la proporción de proteínas de bajo peso molecular sería mayor que en el extracto crudo. En este sentido, es posible proponer que el tratamiento térmico no afecta la estabilidad de las proteínas de bajo peso molecular, como se informó en el Capítulo 2 de caracterización de EPVs y en artículos de revisión bibliográfica de inhibidores de proteasas vegetales que conservan su actividad biológica tras los tratamientos térmicos (Cotabarren et al., 2020a).

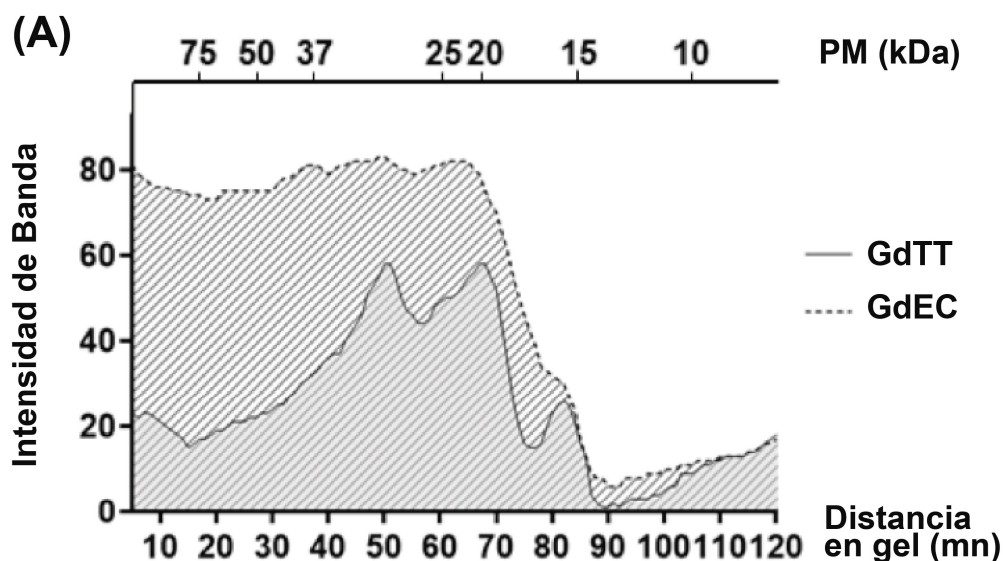


Figura 90. Representación del extracto crudo (GdEC, línea punteada) y tratamiento térmico del extracto crudo (GdHT, línea solida).

4.2. Determinación de IC_{50} por ABTS y DPPH de GdTT, GdEC y fracciones peptídicas.

En este apartado, se evaluó nuevamente la capacidad antioxidante del extracto crudo y la muestra tratada térmicamente para verificar la presencia de péptidos con actividad antioxidante en ambas fracciones, usando esta vez dos métodos de evaluación, ABTS y DPPH y realizando un estudio de IC_{50} . Estos análisis mostraron que los valores de IC_{50} para GdTT ($IC_{50DPPH} = 63,2 \pm 0,6 \mu\text{g} / \text{mL}$; $IC_{50ABTS} = 141,3 \pm 3,1 \mu\text{g} / \text{mL}$) fueron más bajos que los obtenidos para GdEC ($IC_{50DPPH} = 82,5 \pm 1,3 \mu\text{g} / \text{mL}$; $IC_{50ABTS} = 175,7 \pm 4,5 \mu\text{g} / \text{mL}$), lo que se esperaba debido a la purificación generada con el tratamiento térmico. Posteriormente, se cargó 1 mL de GdTT en una concentración de $1767 \mu\text{g} / \text{mL}$ en una columna de exclusión molecular usando un soporte Sephacryl S-100 HR y se eluyó con agua milliQ a un caudal de $0,8 \text{ mL/min}$ (el mismo proceso que se utiliza para purificar parcialmente GdTI). Las fracciones eluidas se controlaron mediante absorbancia a 280 nm , y se evaluó la actividad antioxidante en cada una de ellas para luego agrupar las fracciones que mostraban dicha actividad. La Figura 91. muestra el cromatograma obtenido para la exclusión molecular, a partir de la cual se eligió analizar 4 fracciones principales, denominadas 1, 2, 3 y 4.

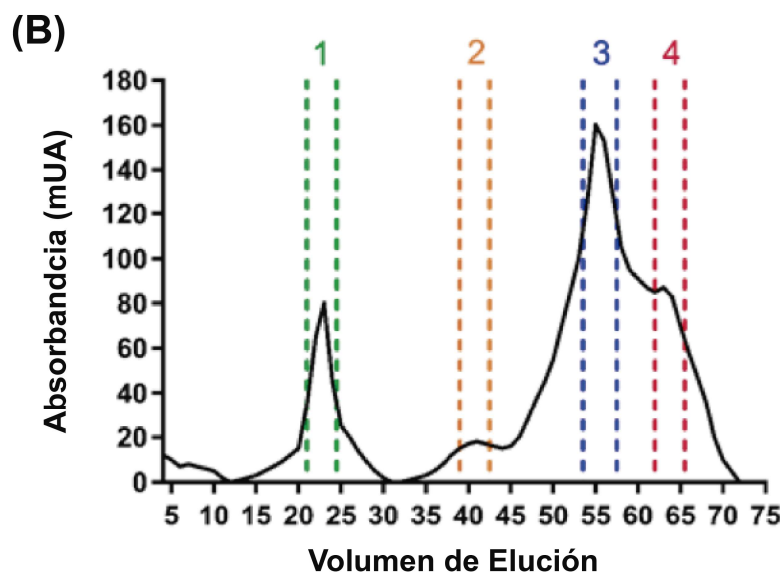


Figura 91. Perfil de elución por cromatografía de exclusión molecular de la muestra tratada térmicamente de *G. decorticans* (GdTT). Las fracciones 1-4 seleccionadas para el análisis posterior se muestran entre líneas de puntos.

Finalmente, la evaluación de la actividad antioxidante se realizó mediante las técnicas ABTS y DPPH para la misma concentración de las fracciones obtenidas por exclusión molecular Figura 96. De esta forma, fue posible observar la presencia de péptidos antioxidantes en las fracciones 2, 3 y 4, con un gran predominio en la fracción 3. Aunque en general los péptidos de bajo peso molecular se relacionan con una mayor capacidad antioxidante (Daliri & Lee, 2017; Ashaolu, 2020; Malekiet al., 2020; Wong et al., 2020), en este caso la fracción 3 tuvo mayor actividad antioxidante que la fracción 4. Esta diferencia podría atribuirse al contenido de aminoácidos de cada fracción peptídica, como se analiza en la siguiente sección. Además, fue posible apreciar diferencias entre las actividades antioxidantes obtenidas por el método ABTS con respecto a la observada para DPPH. Estas diferencias, que también se observaron en los extractos crudos y tratados térmicamente, se pueden explicar por la diferencia en la difusión de los radicales en el medio de reacción; mientras que los radicales ABTS son solubles tanto en disolventes orgánicos como en soluciones acuosas, los radicales DPPH solo son solubles en medio orgánico (Arnao, 2000).

Con base los resultados obtenidos en la Fig. 92, se seleccionó la fracción 3 (a partir de ahora GdAPs) para continuar este estudio.

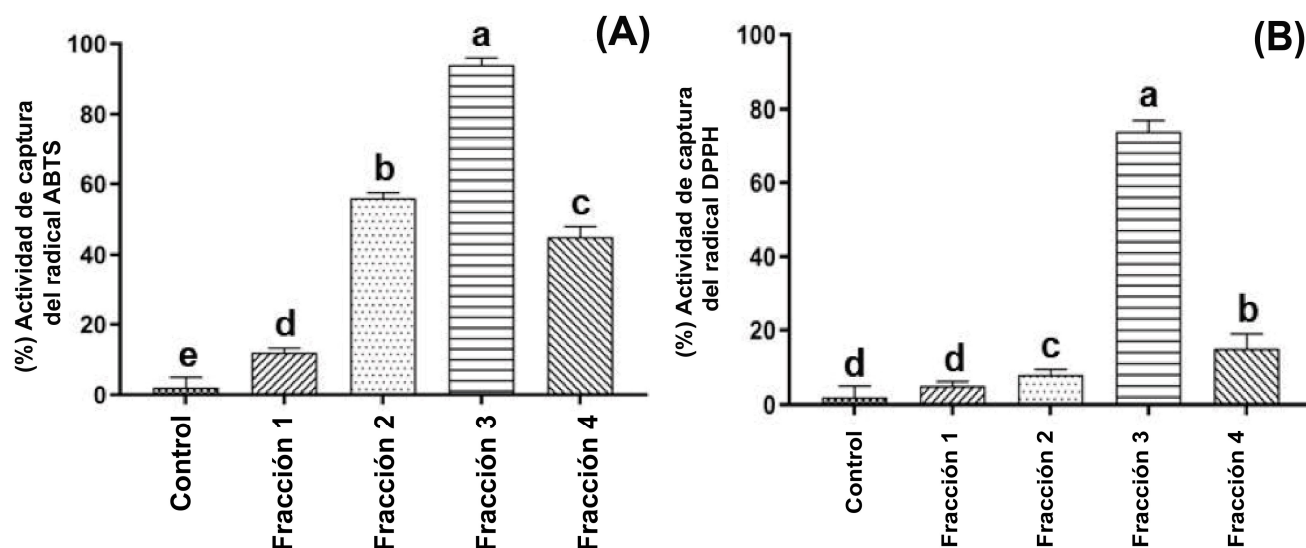


Figura 92. Actividad antioxidante de las fracciones de exclusión por tamaño. (A) Actividad captadora de radicales ABTS. (B) Actividad captadora de radicales DPPH. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar. Las fracciones 1-4 se usaron a la misma concentración. Letras diferentes indican diferencias significativas en $P < 0.05$.

Para realizar una caracterización bioquímica de la fracción proteica con mayor poder antioxidante de GdTT, se evaluó inicialmente la distribución de masa molecular mediante SDS-PAGE seguido de espectrometría de masas MALDI-TOF, que reveló la presencia de tres picos predominantes de bajo peso molecular: 2,257.199 Da, 2,717.165 Da y 5,422.002 Da (Fig. 98A). De esta forma se pudo constatar que la fracción 3 es una fracción rica en péptidos del orden de 2-8 kDa, enriquecida en péptidos de 2,2; 2,7 y 5,4 kDa.

Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de péptidos antioxidantes de *G. decorticans*, en el rango de 0,9 a 10 kDa.

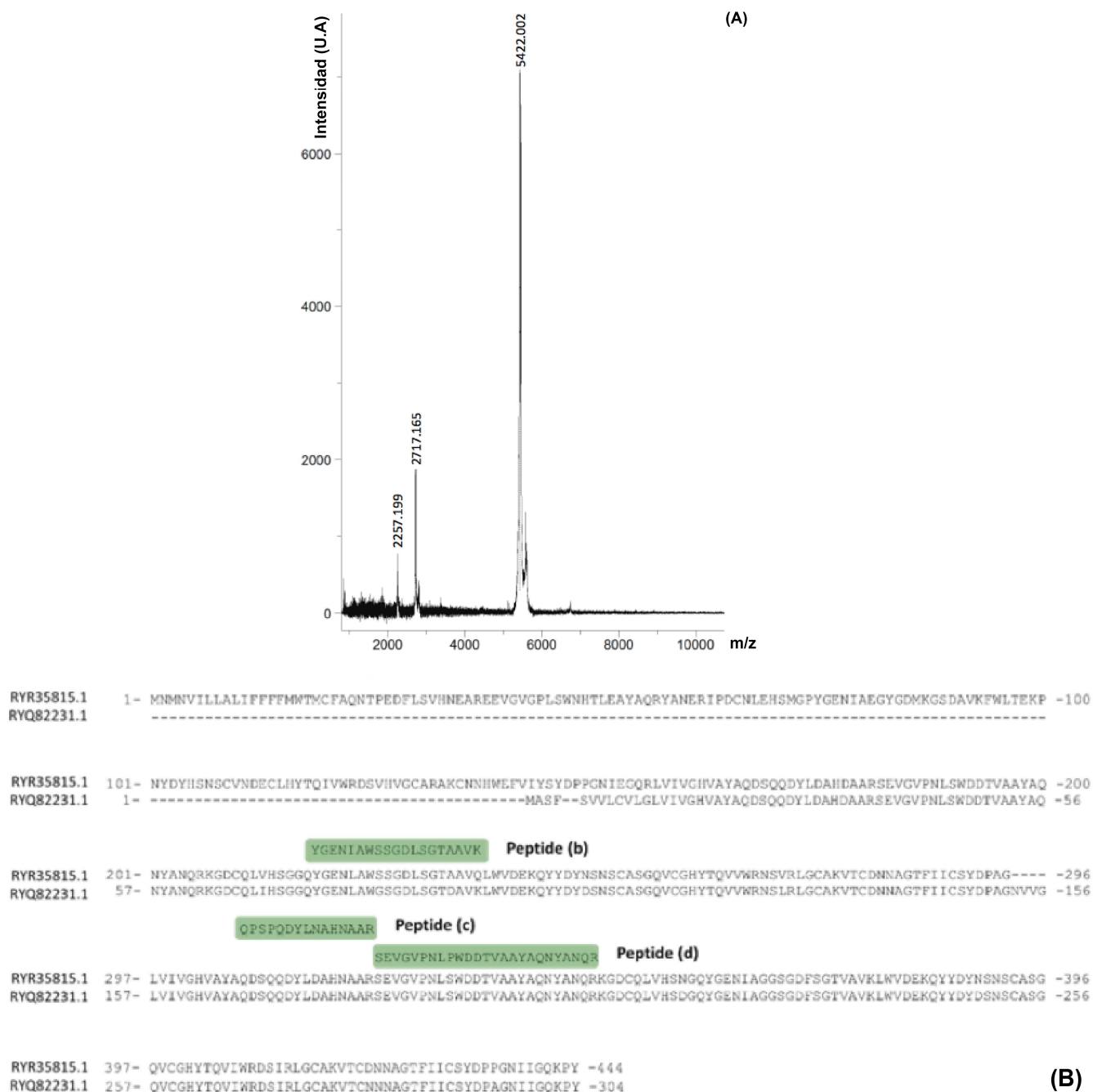


Figura 93. Identificación de péptidos por análisis espectrométrico de masas MALDI-TOF. (A) Espectro MALDI-TOF-MS de GdAPs registrado en un modo positivo lineal (rango de masa de 0,9 a 10 kDa). (B) Alineación de secuencias de los péptidos trópticos identificados por MALDI-TOF MS/MS con las proteínas RYR35815.1 y RYQ82231.1 codificadas en el genoma de *Arachis hypogaea*.

Para identificar las proteínas antioxidantes presentes en la fracción obtenida de semillas de chañar, las bandas obtenidas de la SDS-PAGE se sometieron a digestión trípica. La mezcla resultante de los péptidos obtenidos por digestión trípica se evaluó mediante MALDI-TOF / MS y MALDI-TOF-TOF / MS-MS, a partir de lo cual se pudo deducir la secuencia de aminoácidos de los péptidos que presentaban la mayor señal (Fig. 93.B). Por tanto, fue posible resolver la secuencia de (a) un péptido de 1.267,672 Da: EHIMPLGQNGR; (b) un péptido de 1.682,694 Da: QPSPQDYLNHNAAR; (c) un péptido de 1.925,806 Da: YGENIAWSSGDLSTAAVK; y (d) un péptido de 2.778,353 Da: SEVGVPNLPWDDTVAAQAQNYANQR. Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos del péptido (a) con la base de datos no redundante de NCBI, no se encontró similitud con ninguna de las secuencias de péptidos depositadas en la base de datos. Para las secuencias (b), (c) y (d), la base de datos las identificó con varias proteínas hipotéticas de otras plantas de la familia Fabaceae (Figura 93. B). El alineamiento entre las secuencias depositadas en la base de datos y los péptidos (b), (c) y (d), muestra que estos tres péptidos corresponden a diversas regiones encontradas en proteínas hipotéticas obtenidas de la secuenciación del genoma de *Arachis hypogaea*. Estas proteínas surgen de la secuenciación del genoma completo de la planta de origen y representan proteínas predichas en base a la secuencia genómica, sin haber sido aisladas, purificadas y / o caracterizadas.

Por tanto, este resultado está de acuerdo con la presencia de proteínas recién descubiertas en GdAPs que no se han caracterizado previamente.

Tabla 18. Secuencias de proteínas obtenidas de la base de datos NCBI.

Organismo	Q. C.	E value	Identidad
<i>Arachis duranensis</i>	100 %	$1 \times e^{-6}$	93,33 %
<i>Arachis hypogaea</i>	100 %	$1 \times e^{-6}$	93,33 %
<i>Vigna unguiculata</i>	100 %	$1 \times e^{-5}$	86,67 %
<i>Vigna unguiculata</i>	100 %	$1 \times e^{-5}$	86,67 %
<i>Abrus precatoris</i>	100 %	$1 \times e^{-5}$	86,67 %
<i>Arachis hypogaea</i>	100 %	$1 \times e^{-9}$	94,44 %
<i>Arachis duranensis</i>	94 %	$1 \times e^{-9}$	94,44 %
<i>Arachis hipogaea</i>	94 %	$1 \times e^{-9}$	94,44 %
<i>Prosopis alba</i>	100 %	$1 \times e^{-8}$	84,21 %
<i>Arachis duranensis</i>	100 %	$1 \times e^{-6}$	84,21 %
<i>Arachis hypogaea</i>	100 %	$1 \times e^{-18}$	96 %
<i>Arachis hypogaea</i>	100 %	$1 \times e^{-18}$	96 %
<i>Arachis duranensis</i>	100 %	$1 \times e^{-18}$	96 %
<i>Arachis ipaensis</i>	100 %	$1 \times e^{-18}$	96 %
<i>Arachis ipaensis</i>	100 %	$1 \times e^{-18}$	96 %

Después de realizar una búsqueda de similitud de secuencias para los péptidos (b), (c) y (d). (Q. C.) *Query coverage*: porcentaje de secuencia alineada con respecto a la secuencia modelo disponible en el *Genbank*. *E value* (valor esperado, E): Parámetro que describe el número de hits que uno puede esperar ver debido al azar cuando busca en una base de datos de un tamaño particular.

Cuanto más bajo es el *E value*, es menos probable que sea una similitud por azar.

El efecto de la composición de aminoácidos de los péptidos sobre la actividad antioxidante se ha destacado en la literatura. Se ha informado una alta proporción de aminoácidos hidrófobos en péptidos con alta actividad antioxidante, en comparación con otros aminoácidos hidrófilos, que se considera el factor clave en la capacidad del péptido para eliminar radicales (Zouet al., 2016). Los aminoácidos hidrófobos probados con frecuencia incluyen His, Trp, Phe, Pro, Gly, lys, Ile y Val. A sus residuos se les atribuye una fuerte actividad captadora de radicales en reacciones oxidativas, especialmente para reacciones catalizadas por enzimas, debido a la presencia de un anillo de imidazol como un importante donante de protones (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Otro estudio mostró que la capacidad antioxidante de los péptidos podría mejorarse notablemente con la presencia de tres aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe) (Girgih et al., 2014). Además, el anillo indol y

pirrolidina en Trp y Pro, respectivamente, también podrían servir como donantes de hidrógeno a través de sus grupos hidroxilo, actuando, así como captadores de radicales hidroxilos. Los otros aminoácidos, es decir, Gly, Lys, Ile y Val, pueden ser responsables de formar un microambiente hidrófobo favorable para los péptidos. Como se observa a partir de la secuencia parcial de aminoácidos obtenida para las GdAPs, los cuatro péptidos identificados exhibieron aminoácidos hidrófobos en su secuencia, de acuerdo con la composición de aminoácidos que es característica de los péptidos antioxidantes (Samaranayaka & Li-Chan, 2011; Girgih et al., 2014; Zouet et al., 2016).

Finalmente, la caracterización de la capacidad antioxidante de las GdAPs se llevó a cabo determinando la concentración de péptidos a la que se produce el 50% de actividad antioxidante. Para ello, evaluamos la actividad antioxidante utilizando el método ABTS y DPPH para cinco concentraciones de GdAPs (Figura 99.). Observamos una IC_{50} de $95,1 \pm 0,6 \mu\text{g} / \text{mL}$ para el método ABTS y una IC_{50} de $35,5 \pm 0,3 \mu\text{g} / \text{mL}$ para el método DPPH. Estos valores están en el rango de los valores de IC_{50} de otros péptidos antioxidantes obtenidos por aislamiento directo de la planta de origen (Hong et al., 2014; Ningappa & Srinivas, 2008; Siswoyo et al., 2011; Srivastava et al., 2012). Además, los resultados de las IC_{50} obtenidas para GdAPs respecto a los valores de GdTT muestran que disminuyeron a la mitad para ambos métodos, lo que es consistente con la purificación obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular Fig. 97. Las metodologías de purificación utilizadas aquí, aunque simples y de fácil acceso, arrojaron un 14,1% y un 2,3 y 1,9 veces de purificación cuando se analizaron por DPPH y ABTS, respectivamente, similar al porcentaje de purificación observado por Huang et al. (Huang et al., 2010).

Por tanto, la producción de péptidos antioxidantes a partir de semillas de chañar es altamente factible de escalar a nivel industrial, ya que no requiere grandes inversiones ni procesos muy extensos.

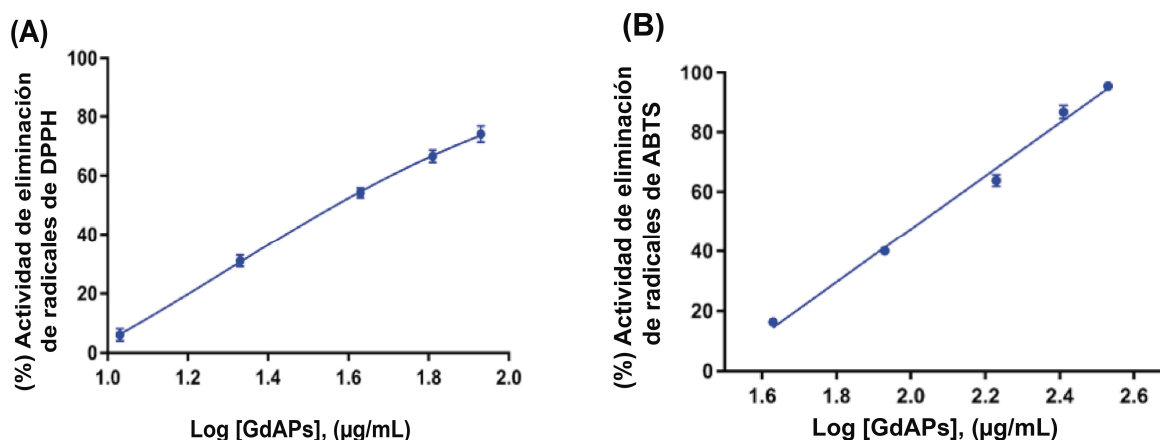


Figura 94. Actividad antioxidante de los péptidos antioxidantes de *Geoffroea decorticans*. (A) Actividad captadora de radicales DPPH. (B) Actividad captadora de radicales ABTS. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar.

Tabla 19. Purificación de GdAPs y cambio de actividad antioxidante durante la etapa de purificación.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Rendimiento (%)	Inhibición por DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	Grado de Purificación ^a	Inhibición por ABTS IC ₅₀ (µg/mL)	Grado de Purificación ^b
Extracto crudo	21.4 ± 0.4	100	82.5 ± 1.2	1	175.7 ± 3.1	1
Extracto con TT 90 °C	17.7 ± 0.5	82.6 ± 0.7	63.2 ± 0.8	1.3 ± 0.1	141.3 ± 2.7	1.2 ± 0.1
Cromatografía de exclusión	3.1 ± 0.2	14.1 ± 0.3	35.5 ± 0.5	2.3 ± 0.1	95.1 ± 0.9	1.9 ± 0.1

^a Calculada en base a la inhibición por DPPH. ^b Calculada en base a la inhibición por ABTS.

Aunque la mayoría de los péptidos antioxidantes reportados hasta la fecha corresponden a péptidos generados por hidrólisis enzimática (Ashaolu, 2020; Wong et al., 2020), también se han reportado péptidos nativos aislados de diferentes especies vegetales que tienen dicha actividad biológica (Tabla 19).

La ventaja de la purificación de péptidos nativos radica en la optimización en el proceso de producción, ya que los costos de obtención de los mismos para su posterior aplicación en la industria biomédica y/o alimentaria son muy reducidos en comparación con

los péptidos antioxidantes obtenidos por hidrólisis enzimática. Además, los pasos de purificación se reducen considerablemente, haciendo que el proceso de escalado sea más factible a nivel industrial. Finalmente, al purificar los péptidos antioxidantes nativos se reducen los efectos secundarios asociados a los péptidos producidos por hidrólisis enzimática, como la producción de alérgenos y el sabor amargo en el producto final, potenciando así la aplicación de estos péptidos a la conservación de alimentos y en la industria nutra-farmacéutica (Ashaolu & Yupanqui, 2018; Reddi, Kapila, Dang, & Kapila, 2012). Los péptidos antioxidantes presentes en *G. decorticans* no solo se encuentran dentro del rango inferior de peso molecular obtenido para otros péptidos, sino que también tienen una mayor capacidad antioxidante que otros péptidos / proteínas nativas reportados hasta la fecha, como GSQ (Hong et al., 2014), G4b (Huang et al., 2010), QCZDE y QCZCM (Yili et al., 2012), TCP-III (Srivastava et al., 2012), APC (Ningappa & Srinivas, 2008).

Tabla 20. Péptidos/proteínas antioxidantes nativas aisladas de diferentes fuentes vegetales en la última década.

Péptido/Proteína antioxidante	Fuente Vegetal	PM (Da)	IC ₅₀ DPPH (µg/mL)	IC ₅₀ ABTS (µg/mL)	Referencia
GSQ	<i>Allium tuberosum</i> Rooting	290.10	610	40	(Hong et al., 2014)
G4b	<i>Ginkgo biloba</i> semillas	29.247	100.7	n/d	(Huang et al., 2010)
QCZDE	<i>Apium graveolens</i> semillas	6,500	n/d	158.7	(Yili et al., 2012)
QCZCM	<i>Apium graveolens</i> semillas	11,390	n/d	193.2	(Yili et al., 2012)
Gg-AOPI	<i>Gnetum gnemon</i> semillas	30,000	21	10	(Siswoyo et al., 2011)
Gg-AOPII	<i>Gnetum gnemon</i> semillas	12,000	27	12	(Siswoyo et al., 2011)
PA-CC	<i>Curcuma comosa</i> Roxb. Rizomas	18,000	n/d	n/d	(Boonmee, Srisomsap, Karnchanatat, & Sangvanich, 2011)
PNP	<i>Phyllanthus nuri</i> hojas	35,000	n/d	n/d	(Sarkar, Kinter, Mazumder, & Sil, 2009)
TCP-III	<i>Terminalia chebula</i> frutost	16,267	291	n/d	(Srivastava et al., 2012)
APC	<i>Murraya koenigii</i> semillas	35,000	70	n/d	(Ningappa & Srinivas, 2008)
GdAPs	<i>Geoffrea decorticans</i> semillas	2,000-8,000	35.5	95.1	(Cotabarren et al 2022)

n/d: no determinada.

G. decorticans representa una nueva especie fuente de péptidos termoestables que tienen capacidad antioxidante para ensayos in vitro de ABTS y DPPH. En el futuro, sería interesante evaluar la capacidad antioxidante en modelos celulares y realizar pruebas de citotoxicidad con el fin de establecer dosis seguras para su uso en la industria biomédica y / o alimentaria.

4.4. Actividad anticoagulante de los GdAPs.

En este ítem de este capítulo se evaluó la actividad anticoagulante de la fracción GdAPs sobre ambas vías de la coagulación. No se observó actividad anticoagulante sobre la vía extrínseca (TP), pero sí se observaron resultados alentadores sobre la inactivación de la vía intrínseca, a través del ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Como se muestra en la Figura 95. A, los GdAPs purificados provocaron una prolongación del tiempo de coagulación de manera dependiente de la dosis.

Un parámetro clave importante que se extrae de este ensayo in vitro es la dosis del anticoagulante que proporciona una prolongación del doble del tiempo de coagulación en comparación con las muestras no tratadas. Esto permite medir el efecto de nuestros péptidos frente a los factores VIII, IX, XI, XII y Precalicroína de la cascada de la coagulación. Los GdAP mostraron un tiempo de prolongación del doble en concentraciones en el rango de 86 a 215 $\mu\text{g/mL}$, con un valor IC_{50} de $\sim 82 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 95. B). Asimismo, el tiempo de protrombina (PT) no aumentó significativamente en presencia de GdAP en el rango de concentraciones ensayadas.

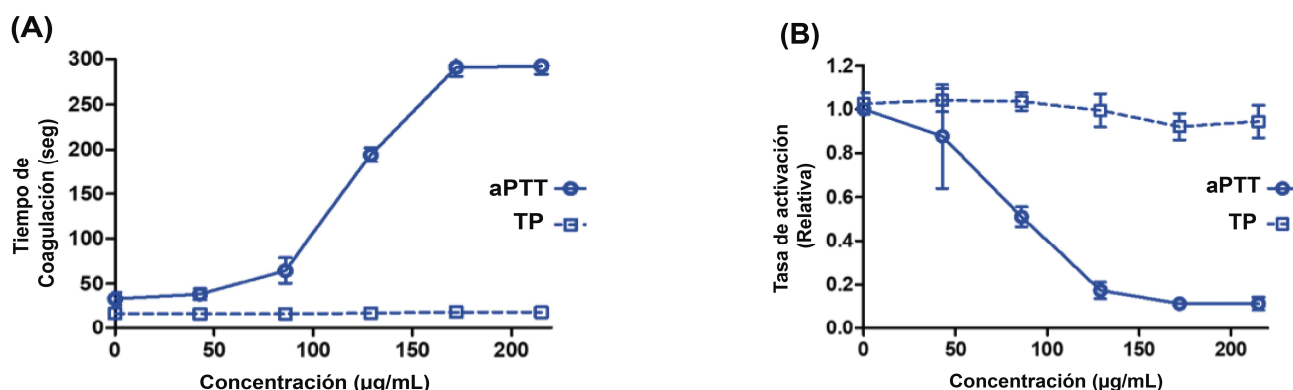


Figura 95. Actividad anticoagulante de los GdAP sobre la Tromboplastina Parcial activada (aPTT) y la Protrombina (PT). **(A)**. Efecto de la concentración de GdAP en el tiempo de coagulación y **(B)** Tasa de activación de aPTT y PT. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar de tres medidas independientes ($n = 3$).

A modo de comparación, la heparina, un fármaco de uso común en aplicaciones clínicas, en una concentración de 2 mg/mL, produce un retraso en el tiempo de coagulación para la ruta aPTT de 18 a 300 s (Indumathi, et al., 2016), mientras que GdAPs produce el mismo efecto a concentraciones mucho más bajas de 172 µg/mL. Este comportamiento se informó previamente para otros péptidos de origen vegetal, como los inhibidores de tripsina de *Leucaena leucocephala* (Oliva, et al., 2000), *Enterolobium contortisiliquum* (Batista, et al., 1996) y *Maclura pomifera* (Lazza, et al., 2010).

5. Conclusiones de este capítulo.

G. decorticans representa una nueva especie fuente de péptidos termoestables que tienen alta capacidad antioxidante. Sería interesante evaluar la capacidad antioxidante en modelos celulares y realizar pruebas de citotoxicidad con el fin de establecer dosis seguras para su uso en la industria biomédica y / o alimentaria. Además, se observa que los GdAPs poseen efectos beneficiosos significativos como fármacos anticoagulantes, retrasando el tiempo de coagulación de la vía intrínseca. Estos resultados alientan futuros estudios sobre el mecanismo de acción de los GdAPs y el desarrollo de ensayos in vivo que podrían ser prometedores para una posible explotación de estos péptidos como agentes antioxidantes y antitrombóticos naturales. También, estos péptidos tienen una notable estabilidad térmica, al igual que los IPPs estudiados en este trabajo de tesis, aportando un beneficio adicional en lo que respecta a sus condiciones de conservación sin necesidad de refrigeración. Esto permitiría adaptar sus usos a muchas regiones geográficas del mundo que tienen escasez de tecnologías e infraestructura adecuada para el almacenamiento.

Resumen de conclusiones específicas.

- Al eluir una muestra de GdTT en una columna de exclusión molecular se obtuvieron distintas fracciones con actividad antioxidante detectadas mediante las técnicas ABTS y DPPH.
- La fracción con mayor capacidad antioxidante, denominada GdAPs, presentó una IC_{50} de $95,1 \pm 0,6 \mu\text{g} / \text{mL}$ para el método ABTS y una IC_{50} de $35,5 \pm 0,3 \mu\text{g} / \text{mL}$ para el método DPPH.
- Los GdAPs son capaces de generar una prolongación del tiempo de coagulación sobre la vía intrínseca, duplicando dicho tiempo en concentraciones en el rango de 86 a 215 $\mu\text{g/mL}$, con un valor IC_{50} de $\sim 82 \mu\text{g/m}$.

Conclusiones generales

En el marco de esta tesis doctoral se han estudiado extractos vegetales aislados de alimentos de origen vegetal, con el fin de evaluar actividades biológicas tales como antioxidante, antibacteriana, hipoglucemiante, etc. Asimismo, de varios extractos, se han aislado diversos inhibidores de proteasas con acción anticoagulante, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, hipoglucemiante, etc. Por otro lado, en uno de los extractos se evaluó la propiedad antioxidante de una fracción de sus péptidos constituyentes. Los resultados obtenidos para los extractos y las biomoléculas, abren la puerta para sus análisis y ensayos como potenciales como agentes medicinales, anti-infectivos naturales y/ o conservantes biológicos; como ser, emplearlos en el desarrollo de formulaciones antibióticas naturales y/o conservantes naturales de alimentos, o como alternativa terapéutica natural como agentes anticoagulantes, antioxidantes e hipoglucemiantes para su potencial uso en el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas prevalentes, como las cardiovasculares y sus comorbilidades (trombosis, hipertensión arterial, etc).

Para lograr estos resultados, inicialmente se trabajó en la obtención del material vegetal y la producción de los extractos crudos (Capítulo 2). De esta manera se obtuvieron 16 extractos proteicos vegetales (EPVs) de las ocho fuentes vegetales seleccionadas de consumo humano. Dichos EPVs fueron sometidos a una intensa caracterización bioquímica clásica, que incluyó diferentes parámetros, entre los que destacamos, la determinación de su concentración proteica, su estabilidad térmica, la inhibición de dos proteasas de interés biotecnológico (Papaína y Tripsina). También se incluyeron en el análisis actividades biológicas tales como la actividad antioxidante (en los cuales se destacaron por su alta actividad los extractos de Chañar y Canola), hipoglucemiante (donde resultan interesantes los resultados obtenidos para los extractos de Chañar).

De manera específica y mucho más extendida, también los EPVs fueron estudiados para la búsqueda de propiedades antimicrobianas (antibacterianas y anti cándidas). Para ello, se utilizaron diferentes bacterias representativas de las especies bacterianas más relevantes en las infecciones humanas ambulatorias, pudiéndose encontrar actividad inhibitoria principalmente en los extractos de Moringa. Posteriormente, se realizaron análisis de la posible actividad sinérgica de los EPVs sobre cepas bacterianas con mecanismos de resistencia enzimáticos inducibles, donde particularmente se logró identificar la actividad sinérgica de los extractos de Moringa sobre *K. pneumoniae* BLEE+.

En cuanto a la actividad inhibitoria del crecimiento de cepas de Candidas, solo los extractos de Morrón amarillo presentaron una intensa actividad anti-candidiásica.

Los resultados obtenidos para la caracterización de actividad inhibitoria del crecimiento de microorganismos patógenos, estudios inéditos en el CIPROVE, abren variadas y nuevas líneas de investigación para futuros trabajos, y dejan sentadas las bases y estructuras para la incorporación de dichos experimentos en nuestro laboratorio.

Como continuidad del trabajo doctoral, se comenzó con la búsqueda, identificación, purificación y caracterización de nuevos inhibidores de proteasas (capítulos 3, 4 y 5), que estén presentes en los EPVs en los que se haya encontrado actividades biológicas más relevantes.

Es así que, en el capítulo 3, referido a los estudios realizados con las semillas de *Moringa oleifera*, se aisló y caracterizó un nuevo inhibidor de proteasas cisteínicas, al que se denominó MoPI. Una de las características más importantes de MoPI fue su elevada estabilidad térmica. Además, se verificó que era responsable de la actividad antibacteriana sobre cepas de *E. faecalis* y *S. aureus*. De esta manera MoPI, es una de las moléculas que aporta a la actividad inhibitoria de estas bacterias, encontrada en los extractos de Moringa (MoEC y MoTT). Finalmente se halló en MoPI actividad inhibitoria de la vía intrínseca de la coagulación, abriendo una importante alternativa futura para su uso terapéutico.

En el capítulo 4, referido a semillas de *Geoffrea decorticans* se logró el aislamiento, purificación y el estudio cinético-molecular de un nuevo inhibidor de proteasas serínicas, denominado GdTI. Mediante ensayos de caracterización se pudo corroborar que GdTI poseía actividad antioxidante, pero no era el responsable de los altos valores de capacidad antioxidante encontrados en los extractos GdEC y GdTT. Asimismo, a través de estudios de estabilidad se demostró que GdTI posee elevada estabilidad térmica, incluso en ebullición a tiempos de incubación largos. Además, GdTI mostró importante actividad inhibitoria de la vía intrínseca de la coagulación y de la enzima α -glucosidasa, abriendo también dos nuevas e interesantes líneas de investigación para su aplicación terapéutica.

En el capítulo 5, se consiguió aislar de semillas de *Capsicum annuum* (variedad de morrón amarillo), un inhibidor de proteasas serínicas, al que se denominó YBPTI. Los resultados obtenidos muestran que YBPTI no solo presenta actividad inhibitoria de tripsina, sino también presenta actividad antioxidante, inhibitoria de la enzima α -glucosidasa y antifúngica frente a varias especies de levaduras. Todas estas propiedades convierten a YBPTI es una molécula versátil con potenciales acciones en enfermedades cardiovasculares y metabólicas por su capacidad antioxidante e hipoglucemiante. Para este inhibidor se pudo realizar un estudio de su citotoxicidad, donde se evidenció sus bajos niveles de daño celular aún en concentraciones donde mantiene buena acción biológica. Los resultados obtenidos

para YBPTI abren las puertas para el estudio de esta molécula en nuevas líneas de investigación y para el potencial uso de YBPTI en diferentes recursos terapéuticos.

Finalmente, el capítulo 6 estuvo dirigido a la identificación y caracterización de péptidos nativos (no inhibidores de proteasas) con actividad antioxidante y anticoagulante. Los mismos fueron obtenidos a partir de semillas de *Geoffroea decorticans* y se los denominó GdAPs. De acuerdo a los resultados obtenidos en los capítulos 2 y 4 para los extractos GdEC y GdTT, en los que se observó una importante actividad antioxidante, no se pudo asignar totalmente (en el capítulo 4) dicha capacidad al inhibidor GdTI. Es así que en el capítulo 6 se logró identificar a los péptidos GdAPs como la fracción péptidos termoestables responsable de la elevada capacidad antioxidante de las fracciones proteicas de los extractos de chañar. Además, se observa que los GdAPs presentarían efectos beneficiosos significativos como fármacos anticoagulantes, por su posibilidad de provocar el retraso del tiempo de coagulación de la vía intrínseca. Estos resultados alientan futuros estudios sobre el mecanismo de acción de los GdAPs y el desarrollo de ensayos *in vivo* que podrían ser prometedores para una posible explotación de estos péptidos como agentes antioxidantes y antitrombóticos naturales. Adicionalmente, su notable estabilidad térmica brindaría un beneficio adicional en lo que respecta a sus condiciones de conservación sin necesidad de refrigeración. Esto permitiría adaptar sus usos a muchas regiones geográficas del mundo que tienen escasez de tecnologías e infraestructura adecuada para el almacenamiento.

Bibliografía

- Abarca G, Herrera ML. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev Med Hosp Nac Niños (Costa Rica)*. 2001; 36:1-5.
- Abbas, Ali Taher; SALIH, Hind Abdallah; HASSAN, Bassam A. Review of Beta lactams. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 2022, vol. 26, no 01, p. 1863-1881.
- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940; 146:837.
- Abreu-Payrol, J.; Obregón, W.D.; Claver, P.S.; Cotabarren, J. Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de extractos peptídicos de semillas de *Moringa oleifera* L. *Rev. Cs. Farm. Y Alim*. 2017, 3, 236.
- Adewole, K.E.; Adebayo, J.O. Antioxidant Defense System Induced by Cysteine-Stabilized Peptide Fraction of Aqueous Extract of *Morinda Lucida* Leaf in Selected Tissues of *Plasmodium Berghei*-Infected Mice. *J. Integr. Med*. 2017, 15, 388–397.
- Aguirre C., Valdés-Rodríguez S., Mendoza-Hernández G., Rojo-Domínguez A., A. Blanco-Labra, A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae), *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*. 138 (2004) 81–89, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.02.011>.
- Ahmad, Ma, Z., J.; Zhang, H.; Khan, I.; Muhammad, S. Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (*Moringa oleifera*) as a potential functional food. *S. Afr. J. Bot*. 2020, 129, 40–46.
- Alarcón F.J., F.L. García-Carreño, M.A. Navarrete Del Toro, Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*, *Fish Physiol. Biochem*. 24 (2001) 179–189. doi:10.1023/A:1014079919461.
- Almeida, Édipo S., Débora de Oliveira, and Dachamir Hotza. "Properties and applications of *Morinda citrifolia* (noni): A review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18.4 (2019): 883-909.
- Ananou S, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Gálvez A, Valdivia E. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* 2007;45(1):19-23.
- Angulo, Andrés Felipe, Ricardo Andrés Rosero, and Martha Sofía González Insuasti. "Estudio etnobotánico de las plantas medicinales utilizadas por los habitantes del corregimiento de Genoy, Municipio de Pasto, Colombia." *Universidad y Salud* 14.2 (2012): 168-185.
- Anwar F., Latif S., Ashraf M., Gilani A.H. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother Res.: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21 (2006), pp. 17-25

- Arolas J.L., J. Vendrell, F.X. Aviles, L.D. Fricker, Metalloproteases: emerging drug targets in biomedicine., Curr. Pharm. Des. 13 (2007) 349–366.
- Arribas J.R., F. Pulido, R. Delgado, A. Lorenzo, P. Miralles, A. Arranz, J.J. Gonzalez-Garcia, C. Cepeda, R. Hervás, J.R. Pano, F. Gaya, A. Carcas, M.L. Montes, J.R. Costa, J.M. Pena, Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1 viral suppression: 48-week results of a randomized, controlled, open-label, proof-of-concept pilot clinical trial (OK Study)., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 40 (2005) 280–287.
- Ashaolu, T.J.; Yupanqui, C.T. Hypoallergenic and Immunomodulatory Prospects of Pepsin-Educed Soy Protein Hydrolysates. Croat. J. Food Sci. Technol. 2018, 10, 270–278.
- Assefa, S.T.; Yang, E.-Y.; Chae, S.-Y.; Song, M.; Lee, J.; Cho, M.-C.; Jang, S. Alpha Glucosidase Inhibitory Activities of Plants with Focus on Common Vegetables. Plants 2020, 9, 2. <https://doi.org/10.3390/plants9010002>.
- Atkinson, H.J.; Grimwood, S.; Johnston, K.; Green, J. Prototype demonstration of transgenic resistance to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. Transgenic Res. 2004, 13, 135–142.
- Ayala, Marcela Alexandra Miranda, and Elsa Noralma Lucas Parrales. "Prevalencia de Pseudomonas Aeruginosa productora de Carbapenemasa en pacientes de cuidados intensivos en hospitales de Latinoamérica." Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria Pentaciencias 5.3 (2023): 343-357.
- Azarkan, M.; Dibiani, R.; Goormaghtigh, E.; Raussens, V.; Baeyens-Volant, D. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta 2006, 1764, 1063–1072.
- Bancesi, A.; Pinto, M.M.F.; Duarte, E.; Catarino, L.; Nazareth, T. The antimicrobial properties of *Moringa oleifera* Lam. for water treatment: A systematic review. SN Appl. Sci. 2020, 2, 323.
- Bang, O.Y.; Chung, J.-W.; Lee, M.J.; Seo, W.-K.; Kim, G.-M.; Ahn, M.-J.; Investigators, O.-C.S. Cancer-Related Stroke: An Emerging Subtype of Ischemic Stroke with Unique Pathomechanisms. J. Stroke 2020, 22, 1–10.
- Barberis S., H.G. Quiroga, C. Barcia, J.M. Talia, N. Debattista, Natural Food Preservatives Against Microorganisms, Elsevier Inc., 2018. doi:10.1016/B978-0-12-814956-0.00020-2.
- Barbosa Pelegrini, R.P. Del Sarto, O.N. Silva, O.L. Franco, M.F. Grossi-De-Sa, Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work? Biochem. Res. Int. 2011 (2011), <http://dx.doi.org/10.1155/2011/250349>, Article ID 250349, 9 pages.
- Bártová, v.; Bárta, J. Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice. Research in Agricultural Engineering, 2008, vol. 54, no 4, p. 170.

- Bazile, D.; Jacobsen, S.E.; Verniau, A. 2016. The Global Expansion of Quinoa: Trends and Limits. *Front Plant Sci.* 7: 622.
- Batista, I.F.; Oliva, M.L.V.; Araujo, M.S.; Sampaio, M.U.; Richardson, M.; Fritz, H.; Sampaio, C.A. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry* 1996, 41, 1017–1022.
- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966, 45, 493–496.
- Bayés, M.R. de la Vega, J. Vendrell, F.X. Aviles, M.A. Jongsma, J. Beekwilder, Response of the digestive system of *Helicoverpa zea* to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36 (2006) 654–664. doi:10.1016/j.ibmb.2006.05.010.
- Behrendt N., Matrix Proteases in Health and Disease, 2012. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Matrix+Proteases+in+Health+and+Disease&publication_year=2012&.
- Benchabane M., U. Schlüter, J. Vorster, M.C. Goulet, D. Michaud, Plant cystatins, *Biochimie.* 92 (2010) 1657–1666. doi:10.1016/j.biochi.2010.06.006.
- Bendre A.D., S. Ramasamy, C.G. Suresh, Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights, *Int. J. Biol. Macromol.* 113 (2018) 933–943. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.02.148.
- Berdowska, I.; Siewiński, M. The role of cysteine cathepsins and their inhibitors in physiological and neoplastic processes. *Postępy Biochemii* 2000, 46, 73–84.
- Bergeron, Nielsen S.S., Partial characterization of trypsin inhibitors and Nterminal D. sequences of five trypsin isoinhibitors of great northern beans (*Phaseolus vulgaris*), *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 1544–1549, <https://doi.org/10.1021/jf00034a003>.
- Berkut A.A., D.R. Usmanova, S. Peigneur, P.B. Oparin, K.S. Mineev, T.I. Odintsova, J. Tytgat, A.S. Arseniev, E.V. Grishin, A.A. Vassilevski, Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 14331–14340.
- Berman, J., Krysan, D.J. Drug resistance and tolerance in fungi. *Nat Rev Microbiol* 18, 319–331 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2>.
- Beutler B., Innate immunity: an overview, *Mol. Immunol.* 40 (2004) 845–859.
- Bijina, S. Chellappan, S.M. Basheer, K.K. Elyas, A.H. Bahkali, M. Chandrasekaran, Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization, *Process Biochem.* 46 (2011) 2291–2300. doi:10.1016/j.procbio.2011.09.008.

- Bilska, A.; Wlodek, L. Lipoic Acid-the Drug of the Future? Pharmacol. Rep. 2005, 57, 570–577.
- 18. Butterfield, D.A.; Abdul, H.M.; Opii, W.; Newman, S.F.; Joshi, G.; Ansari, M.A.; Sultana, R. Pin1 in Alzheimer's Disease. J. Neurochem. 2006, 98, 1697–1706.
- Binford S.L., F. Maldonado, M.A. Brothers, P.T. Weady, L.S. Zalman, J.W. 3rd Meador, D.A. Matthews, A.K. Patick, Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor., Antimicrob. Agents Chemother. 49 (2005) 619–626. doi:10.1128/AAC.49.2.619-626.2005.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology. 2015;13(1):42-51.
- Bobbarala V., P.K. Katikala, K.C. Naidu, S. Penumajji, Antifungal activity of selected plants extracts against phytopathogenic fungi *Aspergillus niger*, Indian J. Sci. Technol. (2009) 87–90.
- Bode W, Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur J Biochem. 1992 Mar 1;204(2):433-51. doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16654.x. PMID: 1541261.
- Bojanic, A. 2011. La quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe (FAO/RLC).
- Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. Journal of Internal Medicine. 2003;254(3):197-215.
- Borgonsoli, Christian. *Moringa oleifera* Lam., Una Pianta Ricca Di Proprietà Benefiche. 2021.
- Bortolotti M, Mercatelli D, Polito L. *Momordica charantia*, a Nutraceutical Approach for Inflammatory Related Diseases. Front Pharmacol. 2019 May 8;10:486. doi: 10.3389/fphar.2019.00486. PMID: 31139079; PMCID: PMC6517695.
- Bown D.P., H.S. Wilkinson, J.A. Gatehouse, Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families, Insect Biochem. Mol. Biol. 27 (1997) 625–638. doi:10.1016/S0965-1748(97)00043-X.
- Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 1976, 72 (1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brand-Williams W., M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT - Food Science and Technology, Volume 28, Issue 1, 1995, Pages 25-30, ISSN 0023-6438, [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Brogden K.A., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 3 (2005) 238–250.

- Brunelle, F.; Girard, C.; Cloutier, C.; Michaud, D. A hybrid, broad-spectrum inhibitor of Colorado potato beetle aspartate and cysteine digestive proteinases. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2005, 60, 20–31.
- Brzin J., M. Kidrič, Proteinases and their inhibitors in plants: Role in normal growth and in response to various stress conditions, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 13 (1996) 421–468. doi:10.1080/02648725.1996.10647936.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological Reviews. 2004;198(1):169-84.
- Burchacka, E., Pięta P., Łupicka-Słowik, A. (2021). Recent advances in fungal serine protease inhibitors. Biomedicine & Pharmacotherapy, 24, 29.
- Burchacka, E., Pięta, P., & Łupicka-Słowik, A. (2022). Recent advances in fungal serine protease inhibitors. Biomedicine & Pharmacotherapy, 146, 112523.
- Bush K, Jacoby G, Medeiros A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-1233.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in microbiology. 2001;9(7):327-35.
- Camarena JJ, Sánchez RJDdMHUdPV. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Control Calidad SEIMC. 1999.
- Carrillo, L.; Martínez, M.; Álvarez-Alfageme, F.; Castañera, P.; Smaghe, G.; Díaz, I.; Ortego, F. A barley cysteine-proteinase inhibitor reduces the performance of two aphid species in artificial diets and transgenic Arabidopsis plants. Transgenic Res. 2010, 20, 305–319.
- Carvalho, I.; Carvalho, J.; Castro, A.; Igrejas, G.; Torres, C.; Poeta, P. Genetic diversity among selected ESBL and Carbapenem-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from urocultures in a portuguese hospital, in Proceedings of the 1st International Electronic Conference on Antibiotics—The Equal Power of Antibiotics And Antimicrobial Resistance, 8–17 May 2021, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/ECA2021-09530
- Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev Pan Salud Pública. 2011;30(6):519-28.
- Castro Méndez, Carmen; García Sánchez, Estefanía & Martín Mazuelos, Estrella. Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol 37, Supl 32-39. 2019, doi: 10.1016/S0213-005X(19)30180-6.
- Catalano, M., Ragona L., H. Molinari, A. Tava, L. Zetta, Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (*Medicago scutellata*): solution structure and analysis of self-association behavior, Biochemistry 42 (2003) 2836–2846, <https://doi.org/10.1021/bi020576w>.

- Cavicchioli R., Charlton T., Ertan H., Mohd Omar S., K.S. Siddiqui, T.J. Williams, Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles, *Microb. Biotechnol.* 4 (2011) 449–460, <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00258.x>.
- Chan-Blanco, Yanine, et al. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of food composition and analysis*, 2006, vol. 19, no 6-7, p. 645-654
- Chaoting Wen, Jixian Zhang, Haihui Zhang, Yuqing Duan, Haile Ma, Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 105, 2020, Pages 308-322, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.019>.
- Chaudhury RR, Rafei UM. Traditional medicine in Asia: World Health Organization; 2002.
- Chen G.W., J.G. Chung, H.C. Ho, J.G. Lin, Effects of the garlic compounds diallyl sulphide and diallyl disulphide on arylamine N-acetyltransferase activity in *Klebsiella pneumoniae*., *J. Appl. Toxicol.* 19 (1999) 75–81.
- Chevallet, M.; Luche, S.; Rabilloud, T. Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Nat. Protoc.* 2006, 1 (4), 1852–1858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>.
- Chiche L., A. Heitz, J.-C. Gelly, J. Gracy, P.T.T. Chau, P.T. Ha, J.-F. Hernandez, D. Le-Nguyen, Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins., *Curr. Protein Pept. Sci.* 5 (2004) 341–349.
- Chiche L., G. Postic, P. Charlotte, J. Gelly, KNOTTIN : the database of inhibitor cystine knot scaffold after 10 years , toward a systematic structure modeling, 46 (2018) 454–458. doi:10.1093/nar/gkx1084.
- Cid-Gallegos, M.S., Corzo-Ríos, L.J., Jiménez-Martínez, C. et al. Protease Inhibitors from Plants as Therapeutic Agents- A Review. *Plant Foods Hum Nutr* 77, 20–29 (2022).
- Cingel, J. Savić, J. Lazarević, T. Ćosić, M. Raspor, A. Smigocki, S. Ninković, Co-expression of the proteinase inhibitors oryzacystatin I and oryzacystatin II in transgenic potato alters Colorado potato beetle larval development, *Insect Sci.* 24 (2017) 768–780. doi:10.1111/1744-7917.12364.
- Cisternas, C., Farías, C., Muñoz, L., Morales, G., & Valenzuela, R. (2022). Composición química, características nutricionales y beneficios asociados al consumo de chía (*Salvia hispanica* L.). *Revista chilena de nutrición*, 49(5), 625-636.
- Clemente, M. Del Carmen Arques, Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 10305–10315. doi:10.3748/wjg.v20.i30.10305.

- Clemons P.A., N.E. Bodycombe, H.A. Carrinski, J.A. Wilson, A.F. Shamji, B.K. Wagner, A.N. Koehler, S.L. Schreiber, Small molecules of different origins have distinct distributions of structural complexity that correlate with protein-binding profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 18787–18792. doi:10.1073/pnas.1012741107.
- Connors B.J., N.P. Laun, C.A. Maynard, W.A. Powell, Molecular characterization of a gene encoding a cystatin expressed in the stems of American chestnut (*Castanea dentata*), *Planta*. 215 (2002) 510–514. doi:10.1007/s00425-002-0782-9.
- Cornish-Bowden A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem J* 1974;137:143–4.
- Costa H.P.S., Oliveira J.T.A., Sousa D.O.B., Morais J.K.S., Moreno F.B., Monteiro-Moreira A.C.O., Viegas R.A., Vasconcelos I.M., JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 1–12. doi:10.3389/fmicb.2014.00005.
- Costamagna M.S., Zampini I.C., Alberto M.R., Cuello S., Torres S., Pérez J., C. Quispe, G. Schmeda-Hirschmann, M.I. Isla, Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process, *Food Chem.* 190 (2016) 392–402, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.068>.
- Cotabarren J., M.E. Tellechea, S.M. Tanco, J. Lorenzo, J. Garcia-Pardo, F.X. Avilés, W.D. Obregón, Biochemical and MALDI-TOF mass spectrometric characterization of a novel native and recombinant cystine knot miniprotein from *Solanum tuberosum* subsp. andigenum cv. Churqueña, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1–19. doi:10.3390/ijms19030678.
- Cotabarren, J.; Broitman, D.J.; Quiroga, E.; Obregón, W.D. GdTI, the first thermostable trypsin inhibitor from *Geoffroea decorticans* seeds. A novel natural drug with potential application in biomedicine. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020.b , 148, 869–879.
- Cotabarren, J.; Lufrano, D.; Parisi, M.G.; Obregón, W.D. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Sci.* 2020.a , 292, 110398.
- Cotabarren, J.; Claver, S.; Payrol, J.A.; Garcia-Pardo, J.; Obregón, W.D. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Papain Inhibitor from *Moringa oleifera* with Antimicrobial and Anticoagulant Properties. *Pharmaceutics* 2021, 13, 512.
- Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology.* 2013;303(6):287-92.
- Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2013;1830(6):3670-95.

- Dabhade, A.R.; Mokashe, N.U.; Patil, U.K. Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin inhibitor from *Albizia amara* Boiv. *Process. Biochem.* 2016, 51, 659–674.
- Dantzger M., Vasconcelos I.M., Scorsato V., Aparicio R., S. Marangoni, M.L.R. Macedo, Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: isolation, biochemical properties and insecticidal potential, *Phytochemistry* 118 (2015) 224–235, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.013>.
- Dash, A. Kulkarni, B. Dunn, M. Rao, Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38 (2003) 89–119. doi:10.1080/713609213.
- Davidson PM, Critzer FJ, Taylor TM. Naturally Occurring Antimicrobials for Minimally Processed Foods. *Annual Review of Food Science and Technology* 2013;4(1):163-90.
- De Brito M.S., M.B. Melo, J. Perdigão, D.A. Alves, Partial purification of trypsin / papain inhibitors from *Hymenaea courbaril* L . seeds and antibacterial effect of protein fractions, 43 (2016) 11–18.
- De Leo F., M. Volpicella, F. Licciulli, S. Liuni, R. Gallerani, R. Ceci, PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 347–348. doi:10.1093/nar/30.1.347.
- De Pasquale A. Pharmacognosy: the oldest modern science. *Journal of Ethnopharmacology.* 1984;11(1):1-16.
- De Wet H, Nzama VN, Van Vuuren SF. Medicinal plants used for the treatment of sexually transmitted infections by lay people in northern Maputaland, KwaZulu–Natal Province, South Africa. *South African Journal of Botany.* 2012;78:12-20.
- Deal, C. Potential new drug targets for osteoporosis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2009, 5, 20–27.
- de Souza Ferreira, Cynthia, et al. "Effect of chia seed (*Salvia hispanica* L.) consumption on cardiovascular risk factors in humans: a systematic review." *Nutricion hospitalaria* 32.5 (2015): 1909-1918.
- Deshimaru M., Hanamoto R., Kusano C., Yoshimi S., Terada S., Purification and characterization of proteinase inhibitors from wild soja (*Glycine soja*) seeds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 1897–1903, <https://doi.org/10.1271/ bbb.66.1897>.
- Deutschländer M.S., N. Lall, M. Van de Venter, S. Dewanjee, The hypoglycemic activity of *Euclea undulata* Thunb. var. myrtina (*Ebenaceae*) root bark evaluated in a streptozotocin–nicotinamide induced type 2 diabetes rat model, *South African Journal of Botany*, Volume 80, 2012, Pages 9-12, ISSN 0254-6299, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.02.006>.

- Diaz, M.; Dunn, C.M.; McClements, D.J.; Decker, E.A. Use of Caseinophosphopeptides as Natural Antioxidants in Oil-in-Water Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2365–2370.
- Di Sapio, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M., & Severin, C. (2012). Caracterización morfoanatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispanica* L.(Lamiaceae). *Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(3), 249-268.
- Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 1953;55:170–1.
- Dixon, Anna R.; McMillen, Heather; Etkin, Nina L. Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). *Economic botany*, 1999, p. 51-68.
- Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A. G. C., Da Cunha, M., Alves, E. W., Gomes, V. M. (2006). Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(9), 1323–1332.
- Dokka, M. K., & Davuluri, S. P. (2014). Antimicrobial activity of a trypsin inhibitor from the seeds of *Abelmoschus moschatus* L. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3, 184-99.
- Dunse K.M., J.A. Stevens, F.T. Lay, Y.M. Gaspar, R.L. Heath, M.A. Anderson, Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 15011–15015. doi:10.1073/pnas.1009241107.
- Duque, Elizabeth X. Castrillón, and Walter Darío Cardona Maya. "Infecciones micóticas del tracto urogenital masculino importantes, aunque poco frecuentes: revisión sistemática." *Medicina & Laboratorio* 22.11 (2016): 527-538
- Duvick, J.P., T. Rood, A.G Rao & D.R Marshak (1992) Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.* 267: 18814-20.
- Echeverría, Javier; Paniagua-Zambrana, Narel Y.; Bussmann, Rainer W. *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart F abaceae. *Ethnobotany of the Andes*, 2020, p. 893-896.
- Eikelboom, J.W.; Hirsh, J.; Spencer, F.A.; Baglin, T.P.; Weitz, J.I. *Antiplatelet Drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis*, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012, 141, e89S–e119S.
- Erlanger, B. F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961, 95 (2), 271–278.
- Escobar, Linamaría; RIVERA, Augusto; Aristizábal, Fabio A. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*, 2010, vol. 17, no 1, p. 67-74.

- Estevez, Rogério Lopes, Barbosa, Jd; Da Cruz, Fomin. El cultivo de canola (*Brassica napus* var. oleifera). *Scientia Agraria Paranaensis*, 2014, vol. 13, nº 1, pág. 1-9.
- Fan S.-G., G.-J. Wu, Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects, *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46 (2005) 273–292. doi:10.1007/978-3-540-73589-2_15.
- Farmer E.E., Ryan CA. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Oct;87(19):7713-6. doi: 10.1073/pnas.87.19.7713. PMID: 11607107; PMCID: PMC54818.
- Fernandes K. V., P.A. Sabelli, D.H. Barratt, M. Richardson, J. Xavier-Filho, P.R. Shewry, The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors., *Plant Mol. Biol.* 23 (1993) 215–219.
- Ferraro, F. (2015.). Búsqueda de inhibidores de cisteína proteasas esenciales del parásito *Fasciola hepatica* como potenciales fármacos. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias. [Acceso : 7 de junio 2023]
- Fisher, M.C., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nat Rev Microbiol* 20, 557–571 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>.
- Fox J.L., Antimicrobial peptides stage a comeback, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 379–382.
- Franchini, M.; Marano, G.; Cruciani, M.; Mengoli, C.; Pati, I.; Masiello, F.; Veropalumbo, E.; Pupella, S.; Vaglio, S.; Liumbruno, G.M. COVID-19-Associated Coagulopathy. *Diagnosis* 2020, 7, 357–363.
- Fratianni F, Nazzaro F, Marandino A, Fusco MdR, Coppola R, Feo VD, et al. Biochemical Composition, Antimicrobial Activities, and Anti-Quorum-Sensing Activities of Ethanol and Ethyl Acetate Extracts from *Hypericum connatum* Lam. (Guttiferae). *Journal of Medical Food*. 2013;16(5):454-9.
- Fuentes Castillo C. Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2007;1(2):262.
- García-Olmedo Francisco, Molina Antonio, Segura Ana, Moreno Manuel, The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants, *Trends in Microbiology*, Volume 3, Issue 2, 1995, Pages 72-74, ISSN 0966-842X, [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88879-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88879-4).
- García-Olmedo, F.; Carmona, M. J.; Lopez-Fando, J. J.; Fernandez, J. A.; Castagnaro, A.; Molina, A.; Hernandez-Lucas, C.; Carbonero, P. In *Genes Involved in Plant Defense*; Boller, T.; Meins, F., Eds.; Springer-Verlag: Wien, NY, 1992; pp 283–302.
- García-Parra, Miguel Ángel, and Nubia Zoraida Plazas-Leguizamón. "Análisis del ciclo de vida de las publicaciones sobre la producción de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), a través de curvas en S." *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación* 9.2 (2019): 379-391.

- Gewali MB, Awale S. Aspects of traditional medicine in Nepal. Japan: Institute of Natural Medicine University of Toyama. 2008.
- Giménez, A. M. (2009). Anatomía de madera, corteza y anillos de crecimiento de *Geoffroea decorticans* (Gill., Ex Hook. & Arn.) BurkA. Quebracho (Santiago del Estero), 17(1), 17-25.
- Girgih, A.T.; He, R.; Malomo, S.; Offengenden, M.; Wu, J.; Aluko, R.E. (Structural and Functional Characterization of Hemp Seed *Cannabis Sativa* L.) Protein-Derived Antioxidant and Antihypertensive Peptides. J. Funct. Foods.
- Girjal, V.U.; Neelagund, S.; Krishnappa, M. Antioxidant Properties of the Peptides Isolated From *Ganoderma Lucidum* Fruiting Body. Int. J. Pept. Res. Ther. 2012, 18, 319–325.
- Godbole S.A., Krishna T.G., Bhatia C.R., Purification and characterisation of protease inhibitors from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L) Millsp) seeds, J. Sci. Food Agric. 64 (1994) 87–930022-5142/94/\$09.00.
- Gopalakrishnan, L.; Doriya, K.; Kumar, D.S. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. Food Sci. Hum. Wellness 2016, 5, 49–56.
- Goulet, M.-C.; Dallaire, C.; Vaillancourt, L.-P.; Khalf, M.; Badri, A.M.; Preradov, A.; Duceppe, M.-O.; Goulet, C.; Cloutier, C.; Michaud, D. Tailoring the Specificity of a Plant Cystatin toward Herbivorous Insect Digestive Cysteine Proteases by Single Mutations at Positively Selected Amino Acid Sites. Plant Physiol. 2008, 146, 1010–1019.
- Goyal, R. K., & Mattoo, A. K. (2014). Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. Plant Science, 228, 135-149.
- Graham J.S., C.A. Ryan, Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants., Biochem. Biophys. Res. Commun. 101 (1981) 1164–1170.
- Grosse-Holz F.M., R.A.L. van der Hoorn, Juggling jobs: Roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants, New Phytol. 210 (2016) 794–807. doi:10.1111/nph.13839.
- Gu, C., X. Song, L. Zhao, S. Pan, G. Qin, Purification and characterization of BowmanBirk trypsin inhibitor from soybean, J. Food Nutr. Res. 2 (2014) 546–550, <https://doi.org/10.12691/jfmr-2-9-3>.
- Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. J Molecular Aspects of Medicine. 2006;27(1):1-93.
- Gutierrez-campos R., J.A. Torres-acosta, L.J. Saucedo-arias, M.A. Gomez-lim, The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants, (2000). doi:10.1038/70781.
- Haag A.F., B. Kerscher, S. Dall'Angelo, M. Sani, R. Longhi, M. Baloban, H.M. Wilson, P. Mergaert, M. Zanda, G.P. Ferguson, Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide, J. Biol. Chem. 287 (2012) 10791–10798.

- Habib S.H., H. Kausar, H.M. Saud, Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria* Enhance Salinity Stress Tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes, Biomed Res. Int. 2016 (2016). doi:10.1155/2016/6284547.
- Habib, K.M. Fazili, Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants, 2 (2007) 68–85.
- Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine, Clarendon. Oxford; 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods in enzymology. 186: Elsevier; 1990. p. 1-85.
- Halliwell B. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. Biochemical Pharmacology. 1995;49(10):1341-8.
- Halliwell B. Antioxidants in Human Health and Disease. Annual Reviews Nutrition. 1996;16(1):33-50.
- Haq S.K., R.H. Khan, Characterization of a Proteinase Inhibitor from *Cajanus cajan* (L .), 22 (2003).
- Haq S.K., S.M. Atif, R.H. Khan, Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection, 431 (2004) 145–159. doi:10.1016/j.abb.2004.07.022.
- Haq, S.M. Atif, R.H. Khan, Biochemical characterization, stability studies and N-terminal sequence of a bi-functional inhibitor from *Phaseolus aureus* Roxb. (Mung bean), Biochimie. 87 (2005) 1127–1136. doi:10.1016/j.biochi.2005.05.007.
- Hardy K, Buckley S, Huffman M. Doctors, chefs or hominin animals. Non-edible plants and Neanderthals. Antiquity. 2016;90(353):1373-9.
- Harvey A.L., Natural products in drug discovery, Drug Discov. Today. 13 (2008) 894–901. doi:10.1016/j.drudis.2008.07.004.
- Harvey A.L., R. Edrada-Ebel, R.J. Quinn, The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era, Nat. Rev. Drug Discov. 14 (2015) 111. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>.
- Hasan, M. J., Kulsum, M. U., Ullah, M. Z., Hossain, M. M., & Mahmud, M. E. (2014). Genetic diversity of some chili (*Capsicum annuum* L.) genotypes. International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology, 4(1), 32-35.
- Hass G.M., H. Nau, K. Biemann, D.T. Grahm, L.H. Ericsson, H. Neurath, The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes., Biochemistry. 14 (1975) 1334–1342.
- Hassan M., M. Kjos, I. Nes, D. Diep, F. Lotfipour, Natural antimicrobial pep tides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance, J. Appl. Microbiol. 113 (2012) 723–736.

- Hellinger, R.; Gruber, C.W. Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug Discov. Today* 2019, 24, 1877–1889.
- Hernández-Gómez, José Alfonso, and Salvador Miranda-Colín. "Caracterización morfológica de chíá (*Salvia hispanica*).*" Revista fitotecnia mexicana* 31.2 (2008): 105-105.
- Herrera Chalé, F.G.; Ruiz Ruiz, J.C.; Acevedo Fernández, J.J.; Betancur Ancona, D.A.; Segura Campos, M.R. ACE Inhibitory, Hypotensive and Antioxidant Peptide Fractions from *Mucuna Pruriens* Proteins. *Process Biochem.* 2014, 49, 1691–1698.
- Heutinck K.M., I.J.M. ten Berge, C.E. Hack, J. Hamann, A.T. Rowshani, Serine proteases of the human immune system in health and disease, *Mol. Immunol.* 47 (2010) 1943–1955. doi:10.1016/j.molimm.2010.04.020.
- Hilder V.A., A.M.R. Gatehoued, D. Boulter, Transgenic plants conferring insect tolerance: Protease inhibitor approach, *Eng. Util.* (1993) 317–337.
- Hintz T, Matthews KK, Di R. The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation. *BioMed Research International.* 2015;2015:12.
- Hong, J.; Chen, T.T.; Hu, P.; Yang, J.; Wang, S.Y. Purification and Characterization of an Antioxidant Peptide (GSQ) from Chinese Leek (*Allium Tuberosum Rottler*) Seeds. *J. Funct. Foods* 2014, 10, 144–153.
- Huang G.J., Y.L. Ho, H.J. Chen, Y.S. Chang, S.S. Huang, H.J. Hung, Y.H. Lin, Sweet potato storage root trypsin inhibitor and their peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activity in vitro, *Bot. Stud.* 49 (2008) 101–108.
- Huang, W.; Deng, Q.; Xie, B.; Shi, J.; Huang, F.H.; Tian, B.; Huang, Q.; Xue, S. Purification and Characterization of an Antioxidant Protein from *Ginkgo Biloba* Seeds. *Food Res. Int.* 2010, 43, 86–94.
- Hugon P, Dufour J-C, Colson P, Fournier P-E, Sallah K, Raoult D. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *The Lancet Infectious Diseases.* 2015;15(10):1211-9.
- Hwang, J.-Y.; Shyu, Y.-S.; Wang, Y.-T.; Hsu, C.-K. Antioxidative Properties of Protein Hydrolysate from Defatted Peanut Kernels Treated with Esperase. *LWT-Food Sci. Technol.* 2010, 43, 285–290.
- IGEMF (iGEM). Risk Groups 2019.igem.org/Safety/Risk_Groups2019.
- Indiano-Romacho, P.; Fernández-Tomé, S.; Amigo, L.; Hernández-Ledesma, B. Multifunctionality of Lunasin and Peptides Released during Its Simulated Gastrointestinal Digestion. *Food Res. Int.* 2019, 125, 108513.
- Indumathi P., A. Mehta, A novel anticoagulant peptide from the Nori hydrolysate, *J. Funct. Foods* 20 (2016) 606–617, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.016>.

- Indumathi, P.; Mehta, A. A Novel Anticoagulant Peptide from the Nori Hydrolysate. *J. Funct. Foods* 2016, 20, 606–617.
- Infante, H., Albesiano, S., Arrieta, L., & Gómez, N. (2018). Caracterización morfológica de variedades de *Chenopodium quinoa* cultivadas en el departamento de Boyacá, Colombia. *Revista UDCA. Actualidad & divulgación científica*, 21(2), 329-339.
- Ishihara, T.; Koga, Y.; Mori, K.; Sugasawa, K.; Iwatsuki, Y.; Hirayama, F. Novel strategy to boost oral anticoagulant activity of blood coagulation enzyme inhibitors based on biotransformation into hydrophilic conjugates. *Bioorgan. Med. Chem.* 2014, 22, 6324–6332.
- Ishimoto, M.; Kuroda, M.; Yoza, K.-I.; Nishizawa, K.; Teraishi, M.; Mizutani, N.; Ito, K.; Moriya, S. Heterologous Expression of Corn Cystatin in Soybean and Effect on Growth of the Stink Bug. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012, 76, 2142–2145.
- Iwanaga, S., Yamasaki, N., Kimura, M., & Kouzuma, Y. (2005). Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of kunitz-type protease inhibitors from plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(1), 220–223.
- Jaiswal, N.; Bhatia, V.; Srivastava, S. P.; Srivastava, A. K.; Tamrakar, A. K. Antidiabetic Effect of Eclipta Alba Associated with the Inhibition of Alpha-Glucosidase and Aldose Reductase. *Nat. Prod. Res.* 2012, 26 (24), 2363–2367. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.662648>.
- Janssen, S., Jakobsen, C.M., Rosen, D.M., Ricklis, R.M., Reineke, U., Christensen, S.B., Lilja, H. and Denmeade, S.R. Screening a combinatorial peptide library to develop a human glandular kallikrein 2-activated prodrug as targeted therapy for prostate cancer *Mol Cancer Ther* (2004) 3, 1439-1450.
- Jerez Mompies, E., & Martín Martín, R. (2012). Comportamiento del crecimiento y el rendimiento de la variedad de papa (*Solanum tuberosum* L.) Spunta. *Cultivos tropicales*, 33(4), 53-58.
- Jiménez-Aspee F., Theoduloz C., Soriano M. del P.C., Ugalde-Arbizu M., M.R. Alberto, I.C. Zampini, M.I. Isla, M.J. Simirigiotis, G. Schmeda-Hirschmann, The native fruit *Geoffroea decorticans* from arid Northern Chile: phenolic composition, antioxidant activities and in vitro inhibition of pro-inflammatory and metabolic syndrome associated enzymes, *Molecules* 22 (2017) <https://doi.org/10.3390/molecules22091565>.
- Johnson S.L., M. Pellecchia, Structure- and fragment-based approaches to protease inhibition., *Curr. Top. Med. Chem.* 6 (2006) 317–329.
- Jongsma M. a., C. Bolter, The adaptation of insects to plant protease inhibitors., *J. Insect Physiol.* 43 (1997) 885–895. doi:10.1016/s0022-1910(97)00040-1.
- Joshi B.N., Sainani M.N., Bastawade K.B., Gupta V.S., Ranjekar P.K., Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1998) 382–387.

- Júnior, J.E.M.; Valadares, N.F.; Pereira, H.D.; Dyszy, F.H.; Filho, A.J.D.C.; Uchôa, A.; De Oliveira, A.S.; Carvalho, C.P.D.S.; Grangeiro, T.B. Expression in *Escherichia coli* of cysteine protease inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*): The crystal structure of a single-domain cystatin gives insights on its thermal and pH stability. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 102, 29–41.
- Kalashnikova, E. A. (2003). The effect of *Rhizoctonia solani* Fungus Exometabolites on the Morfo-Physiological Features of the Tube-Grown Potato Plants, Callus Tissue, and Suspension Culture. *Biotechnology in Russia*, (3), 37-42.
- Kennedy A.R., X.S. Wan, Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells*, *Prostate*. 50 (2002) 125–133. doi:10.1002/pros.10041.
- Kervinen J., G.J. Tobin, J. Costa, D.S. Waugh, A. Wlodawer, A. Zdanov, Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting., *EMBO J.* 18 (1999) 3947–3955. doi:10.1093/emboj/18.14.3947. *chnol. Biochem.* 66 (2002) 2287–2291.
- Khan, S.; Ahmad, S.; Siddiqi, M.I.; Bano, B. Physico-chemical and in-silico analysis of a phytocystatin purified from *Brassica juncea* cultivar RoAgro 5444. *Biochem. Cell Biol.* 2016, 94, 584–596.
- Kim J.Y., S.C. Park, I. Hwang, H. Cheong, J.W. Nah, K.S. Hahm, Y. Park, Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 2860–2872. doi:10.3390/ijms10062860.
- Kim M.H., S.C. Park, J.Y. Kim, S.Y. Lee, H.T. Lim, H. Cheong, K.S. Hahm, Y. Park, Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety “Golden Valley,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (2006) 681–686. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.186.
- Kim, J. Y., Park, S. C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J. W., Hahm, K. S., & Park, Y. (2009). Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2860–2872.
- Kim, Y. M.; Wang, M. H.; Rhee, H. I. A Novel α -Glucosidase Inhibitor from Pine Bark. *Carbohydr. Res.* 2004, 339 (3), 715–717. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.11.005>.
- Kimura M., T. Ikeda, D. Fukumoto, N. Yamasaki, M. Yonekura, Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill.), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1995) 2328–2329.
- Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitshashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratiamarcescens*. *Infection*. 1983;11(6):315-7.

- Kobayashi S., K. Asakura, H. Suga, S. Sasaki, High protein intake is associated with low prevalence of frailty among old Japanese women: a multicenter cross-sectional study., *Nutr. J.* 12 (2013) 164. doi:10.1186/1475-2891-12-164.
- Kobayashi, M.-I. Kang, Y. Watai, K.I. Tong, T. Shibata, K. Uchida, M. Yamamoto, Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1., *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 221–229. doi:10.1128/MCB.26.1.221-229.2006.
- Konrad, B.; Anna, D.; Marek, S.; Marta, P.; Aleksandra, Z.; Józefa, C. The Evaluation of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV, α -Glucosidase and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of Whey Proteins Hydrolyzed with Serine Protease Isolated from Asian Pumpkin (*Cucurbita Ficifolia*). *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2014, 20 (4), 483–491. <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9413-0>.
- Kruger, J.; Thomas, C.M.; Golstein, C.; Dixon, M.S.; Smoker, M.; Tang, S.; Mulder, L.; Jones, J.D. A Tomato Cysteine Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance and Suppression of Autonecrosis. *Science* 2002, 296, 744–747.
- Kumar, P., Rao A.G.A., Hariharaputran S., Chandra N., Gowda L.R., Molecular mechanism of dimerization of Bowman-Birk inhibitors: pivotal role of Asp76 in the dimerization, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 30425–30432, <https://doi.org/10.1074/jbc.M402972200>.
- Kuroda M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N.K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, K. Hiramatsu, Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*., *Lancet* (London, England). 357 (2001) 1225–1240. doi:10.1016/s0140-6736(00)04403-2.S.K.
- Lamarre D., P.C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bos, D.R. Cameron, M. Cartier, M.G. Cordingley, A.-M. Faucher, N. Goudreau, S.H. Kawai, G. Kukolj, L. Lagace, S.R. LaPlante, H. Narjes, M.-A. Poupard, J. Rancourt, R.E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y.S. Tsantrizos, S.M. Weldon, C.-L. Yong, M. Llinas-Brunet, An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus., *Nature*. 426 (2003) 186–189. doi:10.1038/nature02099.
- Lamponi, S.; Baratto, M.C.; Miraldi, E.; Baini, G.; Biagi, M. Chemical Profile, Antioxidant, Anti-Proliferative, Anticoagulant and Mutagenic Effects of a Hydroalcoholic Extract of *Tuscan Rosmarinus officinalis*. *Plants* 2021, 10, 97. <https://doi.org/10.3390/plants10010097>.
- Lanzotti, V. The analysis of onion and garlic. *J. Chromatogr. A* 2006, 1112, 3–22.
- Laskowski B.C., R.L. Jaffe, A. Komornicki, Ab initio calculations of phenylene ring motions in polyphenylene oxide, *Int. J. Quantum Chem.* 29 (1986) 563–578. doi:10.1002/qua.560290328.

- Laskowski M Jr, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:593-626. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.003113. PMID: 6996568.
- Lawrence P. K., K. Ram Koundal, Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects, 2002. doi:10.4067/S0717-34582002000100014.2006.03952.x.
- Lazza, C.; Trejo, S.; Obregon, W.; Pistaccio, L.; Caffini, N.; Lopez, L. A Novel Trypsin and α -Chymotrypsin Inhibitor from *Maclura Pomifera* Seeds. *Lett. Drug Des. Discov.* 2010, 7, 244–249.
- Lebovitz, Harold E. Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 1997, vol. 26, no 3, p. 539-551.
- Lee, E.; Lee, J.-O.; Lim, Y.; Kim, J.-Y.; Kim, H.K.; Bang, S.-M. Thrombocytopenia caused by low-dose heparin supplementation of parenteral nutrition solution. *Blood Res.* 2013, 48, 160–163.
- León, C. J., Gómez, S. M., Morantes, S. J., Cordero, C. P., & Ancízar, F. (2006). Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad in vitro. *Biomédica*, 26(1), 161-168.
- Lichtenstein D.A., G.A. Meziere, Relevance of lung ultrasound in the diagnosis of acute respiratory failure: the BLUE protocol., *Chest.* 134 (2008) 117–125. doi:10.1378/chest.07-2800.
- Lim C.O., S.I. Lee, W.S. Chung, S.H. Park, I. Hwang, M.J. Cho, Characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds., *Plant Mol. Biol.* 30 (1996) 373–379.
- Lima, A.M.; Dos Reis, S.P.; De Souza, C.R.B. Phytocystatins and their potential to control plant diseases caused by fungi. *Protein Pept. Lett.* 2015, 22, 104–111.
- Lindahl JF, Grace D. The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. *Infection Ecology & Epidemiology.* 2015;5(1):30048.
- Lizarazo Rodríguez, Jorge Iván. "Fisiopatología de la pancreatitis aguda." *Revista colombiana de Gastroenterología* 23.2 (2008): 187-191.
- Losso, J.N., The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48 (2008) 94–118, <https://doi.org/10.1080/10408390601177589>.
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L & Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine.* 1998;339(8):520-32.
- Lufrano, J. Cotabarren, J. Garcia-Pardo, R. Fernandez-Alvarez, O. Tort, S. Tanco, F.X. Aviles, J. Lorenzo, W.D. Obregon, Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes, *Phytochemistry.* 120 (2015) 36–45. doi:10.1016/j.phytochem.2015.09.010.

- Macedo M.L.R., S.F.F. Ribeiro, G.B. Taveira, V.M. Gomes, K.M.C.A. de Barros, S. Maria-Neto, Antimicrobial Activity of ILTI, a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Inga laurina* (SW.) Willd, Curr. Microbiol. 72 (2016) 538–544. doi:10.1007/s00284-015-0970-z.
- Macedo, M.L.R., Diz Filho, E.B.S., Freire, M.G.M., M.L. V. Oliva, J.T. Sumikawa, M.H. Toyama, S. Marangoni, A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: Purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme, Protein J. 30 (2011) 9–19. doi:10.1007/s10930-010-9296-7.
- Machado R.J.A., Monteiro N.K. V, L. Migliolo, O.N. Silva, L. Franco, S. Kiyota, M.P. Bemquerer, M.F.S. Pinto, A.S. Oliveira, A.F. Uchoa, A.H.A. Morais, E.A. Santos, Characterization and Pharmacological Properties of a Novel Multifunctional Kunitz Inhibitor from *Erythrina velutina* Seeds, 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0063571.
- Mahlo, S. et al., Afr J Tradit Complement Altern Med. (2016) 13(4):216-222, 216, Antioxidant and antifungal activity of selected medicinal plants extracts against phytopathogenic fungi. doi: 10.21010/ajtcam.v13i4.28.
- Malcolm B.A., R. Liu, F. Lahser, S. Agrawal, B. Belanger, N. Butkiewicz, R. Chase, F. Gheyas, A. Hart, D. Hesk, P. Ingravallo, C. Jiang, R. Kong, J. Lu, J. Pichardo, A. Prongay, A. Skelton, X. Tong, S. Venkatraman, E. Xia, V. Girijavallabhan, F.G. Njoroge, SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells., Antimicrob. Agents Chemother. 50 (2006) 1013–1020. doi:10.1128/AAC.50.3.1013-1020.2006.
- Malefo, M. B., Mathibela, E. O., Crampton, B. G., & Makgopa, M. E. (2020). Investigating the role of Bowman-Birk serine protease inhibitor in Arabidopsis plants under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry, 149, 286-293.
- Mandal S., P. Kundu, B. Roy, R.K. Mandal, Precursor of the Inactive 2S Seed Storage Protein from the Indian Mustard *Brassica juncea* Is a Novel Trypsin Inhibitor , J. Biol. Chem. 277 (2002) 37161–37168. doi:10.1074/jbc.m205280200.
- Mares M., B. Meloun, M. Pavlik, V. Kostka, M. Baudys, Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family., FEBS Lett. 251 (1989) 94–98.
- Marlon V. Brito, Cleide de Oliveira, Bruno R. Salu, Sonia A. Andrade, Paula M.D. Malloy, Ana C. Sato, Cristina P. Vicente, Misako U. Sampaio, Francisco H.A. Maffei, Maria Luiza V. Oliva. The Kallikrein Inhibitor from Bauhinia bauhinioides (BbKI) shows antithrombotic properties in venous and arterial thrombosis models. Thrombosis Research. Volume 133, Issue 5. 2014. Pages 945-951. ISSN 0049-3848. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.02.027>.

- Martínez, J. P., Gil, M.L., Casanova, J.L., López-Ribot, J., García de Lomas, J., Sentandreu, R. 1990. Wall mannoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol., 136: 2421-2432.
- Martínez M., Z. Abraham, M. Gambardella, M. Echaide, P. Carbonero, I. Diaz. The strawberry gene Cyf1 encodes a phytocystatin with antifungal properties., J. Exp. Bot. 56 (2005) 1821–1829. doi:10.1093/jxb/eri172.
- Martínez-Sánchez, D., Pérez-Grajales, M., Rodríguez-Pérez, J. E., & Moreno Pérez, E. D. C. (2010). Colecta y caracterización morfológica de 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. Revista Chapingo. Serie horticultura, 16(3), 169-176.
- Martins T.F., I.M. Vasconcelos, R.G.G. Silva, F.D.A. Silva, P.F.N. Souza, A.L.N. Varela, L.M. Albuquerque, J.T.A. Oliveira, A Bowman-Birk Inhibitor from the Seeds of *Luetzelburgia auriculata* Inhibits *Staphylococcus aureus* Growth by Promoting Severe Cell Membrane Damage, J. Nat. Prod. 81 (2018) 1497–1507. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00545.
- Matsui T., Oki T., Osajima Y., Isolation and identification of peptidic aglucosidase inhibitors derived from sardine muscle hydrolyzate, Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci. 54 (1999) 259–263, <https://doi.org/10.1515/znc-1999-3-417>.
- Matsuzaki K., Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1462 (1999) 1–10.
- Medeiros A.F., Costa I.S., Piuvezam G., Medeiros G.CBS, Maciel BLL, Morais AHA. Mechanism of the action of bioactive proteins of vegetables in diabetes mellitus type 2: Systematic review protocol. Medicine (Baltimore). 2019 Sep;98(39):e17326. doi: 10.1097/MD.00000000000017326. PMID: 31574867; PMCID: PMC6775416.
- Meenu Krishnan V.G., K. Murugan, Purification, characterization and kinetics of protease inhibitor from fruits of *Solanum aculeatissimum* Jacq, Food Sci. Hum. Wellness. 4 (2015) 97–107. doi:10.1016/j.fshw.2015.06.003.
- Mello G.C., M.L. V Oliva, J.T. Sumikawa, O.L.T. Machado, S. Marangoni, J.C. Novello, M.L.R. Macedo, Purification and Characterization of a New Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra mollis* Seeds, 20 (2002).
- Melo, I.R.; Dias, L.P.; Araújo, N.M.; Vasconcelos, I.M.; Martins, T.F.; De Moraes, G.A.; Gonçalves, J.F.; Nagano, C.S.; Carneiro, R.F.; Oliveira, J.T. CICPI, a cysteine protease inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has antifungal activity against *Candida tropicalis* by inducing disruption of the cell surface. Int. J. Biol. Macromol. 2019, 133, 1115–1124.
- Memmert, S.; Damanaki, A.; Nogueira, A.V.B.; Eick, S.; Nokhbehaim, M.; Papadopoulou, A.K.; Till, A.; Rath, B.; Jepsen, S.; Götz, W.; et al. Role of Cathepsin S in Periodontal Inflammation and Infection. Mediat. Inflamm. 2017, 017, 1–10.

- Mingqian Fang, Jong-Ho Cha, Hao-Ching Wang, Peng Ye, Bi Chen, Mengrou Chen, Wen-Hao Yang, Xiuwen Yan. An undefined cystatin CsCPI1 from tea plant *Camellia sinensis* harbors antithrombotic activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Volume 159. 2023. 114285. ISSN 0753-3322. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114285>.
- Moenne-Loccoz Y, Powell J, Higgins P, McCarthy J, O’Gara F. An investigation of the impact of bio-control *Pseudomonas Fluorescens* F113 on the growth of sugar beet and the performance of subsequent clover-*Rhizobium* symbiosis. *Appl. Soil. Ecol.* 1998;7:225–237.
- Mohammed, L., Jha, G., Malasevskiaia, I., Goud, H. K., & Hassan, A. (2021). The interplay between sugar and yeast infections: Do diabetics have a greater predisposition to develop oral and vulvovaginal candidiasis. *Cureus*, 13(2).
- Mohanraj S.S., Tetali S.D., Mallikarjuna N., A. Dutta-Gupta, K. Padmasree, Biochemical properties of a bacterially-expressed Bowman-Birk inhibitor from *Rhynchosia sublobata* (Schumach.) Meikle seeds and its activity against gut proteases of *Achaea janata*, *Phytochemistry* 151 (2018) 78–90, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.009>.
- Monteiro Júnior J.E., N.F. Valadares, H.D.M. Pereira, F.H. Dyszy, A.J. da Costa Filho, A.F. Uchôa, A.S. de Oliveira, C.P. da Silveira Carvalho, T.B. Grangeiro, Expression in *Escherichia coli* of cysteine protease inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*): The crystal structure of a single-domain cystatin gives insights on its thermal and pH stability, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 29–41. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.008.
- Montesinos E., Antimicrobial peptides and plant disease control, *FEMS Microbiol. Lett.* 270 (2007) 1–11. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00683.x.
- Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65 (1), 55–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Mownika, S.; Ramya, E. K.; Sharmila, S. Anatomical and histochemical characteristics of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). *health*, 2020, vol. 3, p. 4.
- Moyo, Busani, et al. "Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves." *African Journal of Biotechnology* 10.60 (2011): 12925-12933.
- Mukherjee AK, Rai SK, Thakur R, Chattopadhyay P, Kar SK. Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits in vivo anticoagulant activity and thrombolytic potency. *Biochimie*. 2012 Jun;94(6):1300-8. doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.027. Epub 2012 Feb 24. PMID: 22386870.
- Mulaudzi RB, Ndhlala AR, Kulkarni MG, Finnie JF, Staden JV. Anti-inflammatory and mutagenic evaluation of medicinal plants used by Venda people against venereal and related diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;146(1):173-9.

- Musury, Rosilda Mara y Fernandes, Wedson Desiderio. Estudios de biología floral y sistema reproductivo de *Brassica napus* L. (Cruciferae). Archivos Brasileños de Biología y Tecnología, 2000, vol. 43, pág. 111-117.
- Nadeeshani, Harshani; Hassouna, Amira; LU, Jun. Proteins extracted from seaweed *Undaria pinnatifida* and their potential uses as foods and nutraceuticals. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, vol. 62, no 22, p. 6187-6203.
- Nambisan, B.; Leelamma, S. Enzyme inhibitors in tuber crops and their thermal stability. Plant Foods Hum. Nutr. 1995, 48, 247–257.
- Ndao, M.; Nath-Chowdhury, M.; Sajid, M.; Marcus, V.; Mashiyama, S.T.; Sakanari, J.; Chow, E.; Mackey, Z.; Land, K.M.; Jacobson, M.P.; et al. A Cysteine Protease Inhibitor Rescues Mice from a Lethal *Cryptosporidium parvum* Infection. Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57, 6063–6073.
- Ndiaye, F.; Vuong, T.; Duarte, J.; Aluko, R.E.; Matar, C. Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory and Immunomodulating Properties of an Enzymatic Protein Hydrolysate from Yellow Field Pea Seeds. Eur. J. Nutr. 2012, 51, 29–37.
- Newman D.J., G.M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, J. Nat. Prod. 70 (2007) 461–477. doi:10.1021/np068054v.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products Newman. 2016;79(3):629-61.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products. 2012;75(3):311-35.
- Ngo, D.-H.; Wijesekara, I.; Vo, T.-S.; Van Ta, Q.; Kim, S.-K. Marine Food-Derived Functional Ingredients as Potential Antioxidants in the Food Industry: An Overview. Food Res. Int. 2011, 44, 523–529.
- Ningappa, M.B.; Srinivas, L. Purification and Characterization of ~35 KDa Antioxidant Protein from Curry Leaves (*Murraya koenigii* L.). Toxicol. In Vitro 2008, 22, 699–709.
- Nissen-Meyer J., I.F. Nes, Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action, Arch. Micro biol. 167 (1997) 67–77.
- Nodarse Hernández R, del Campo Abad R. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina como causa de infección de piel y partes blandas. Revista Cubana de Medicina Militar. 2013;42(1):116-23.
- Noruega, A., Reyes, N. & Mendieta, B., 2018. Manejo del vivero de Marango: Una alternativa sostenible de alimentación animal ante el cambio climático. Guía de Establecimiento Vivero Moringa (*Moringa oleifera*): Universidad Nacional Agraria Promarango, I (10), p. 32.

- Obregón W.D., Cisneros J.S., Ceccacci F. and Quiroga E. A highly stable biocatalyst obtained from covalent immobilization of a non-commercial cysteine phytoprotease. (2015). J Bioprocess Biotech 2015, 5:3. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000211>
- Obregón, W. D.; Ghiano, N.; Tellechea, M.; Cisneros, J. S.; Lazza, C. M.; López, L. M. I.; Avilés, F. X. Detection and Characterisation of a New Metalloprotease Inhibitor from *Solanum Tuberosum* Cv. Desirée Using Proteomic Techniques. Food Chem. 2012, 133 (4), 1163–1168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.030>.
- Obregón, W.D.; Liggieri, C.S.; Morcelle, S.R.; Trejo, S.A.; Avilés, F.X.; Priolo, N.S. Biochemical and PMF MALDI-TOF Analyses of Two Novel Papain-like Plant Proteinases. Protein Pept. Lett. 2009, 16, 1323–1333.
- Ojima, H. Shiota, K. Higashi, H. Kamada, Y. Shimma, M. Wada, S. Satoh, An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot, (1997) 99–109.
- Oliva, M.L.; Souza-Pinto, J.C.; Batista, I.F.; Araujo, M.S.; Silveira, V.F.; Auerswald, E.A.; Mentele, R.; Eckerskorn, C.; Sampaio, M.U.; Sampaio, C.A. *Leucaena Leucocephala* Serine Proteinase Inhibitor: Primary Structure and Action on Blood Coagulation, Kinin Release and Rat Paw Edema. Biochim. Biophys. Acta 2000, 1477, 64–74.
- Olsen J., Ong S-E., Man M.. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues*. Molecular & Cellular Proteomics, Volume 3, Issue 6, 2004. Pages 608-614. ISSN 1535-9476. <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>.
- Organización Mundial de la Salud OMS. Orientaciones de la OMS para proteger la salud frente al cambio climático mediante la planificación de la adaptación de la salud. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2019.
- Otlewski, J., & Jelen, F. (2005). New EMBO Member' s Review The many faces of protease protein inhibitor interaction, 24(7), 1303–1310.
- Ottaviani J.I., L. Actis-goretta, J.J. Villordo, C.G. Fraga, Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition, 88 (2006) 359–365. doi:10.1016/j.biochi.2005.10.001.
- Otvos RA, Still KB, Somsen GW, Smit AB, Kool JJSDALSR. Drug discovery on natural products: from ion channels to nachrs, from nature to libraries, from analytics to assays. SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R. 2019;24(3):362-85.
- Padul M. V., R.D. Tak, M.S. Kachole, Protease inhibitor (PI) mediated defense in leaves and flowers of pigeonpea (protease inhibitor mediated defense in pigeonpea), Plant Physiol. Biochem. 52 (2012) 77–82. doi:10.1016/j.plaphy.2011.10.018.

- Pandey A, Kumar S. Perspective on plant products as antimicrobial agents: A review. *Pharmacologia*. 2013;4(7):469-80.
- Pandhare, J.; Zog, K.; Deshpande, V.V. Differential stabilities of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: Effect of various additives on thermostability. *Bioresour. Technol.* 2002, 84, 165–169.
- Parisi MG, Moreno S, Fernández G. Isolation and characterization of a dual function protein from *Allium sativum* bulbs which exhibits proteolytic and hemagglutinating activities. *Plant Physiology Biochemistry*. 2008;46(4):403-13.
- Park Y., B.H. Choi, J.-S. Kwak, C.-W. Kang, H.-T. Lim, H.-S. Cheong, K.-S. Hahm, Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung)., *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 6491–6496. doi:10.1021/jf0505123.
- Pathadka, Swathi, et al. Global consumption trend of antifungal agents in humans from 2008 to 2018: data from 65 middle-and high-income countries. *Drugs*, 2022, vol. 82, no 11, p. 1193-1205., Emily K.; CHATURVEDI, Sudha; CHATURVEDI, Vishnu. So many diagnostic tests, so little time: review and preview of *Candida auris* testing in clinical and public health laboratories. *Frontiers in Microbiology*, 2021, vol. 12, p. 757835.
- Pereira, L. A., Barboza, G. E., Bovini, M. G., De Almeida, M. Z., & Guimarães, E. F. (2011). caracterización y uso de" pimientos" en una comunidad quilombola de la amazonía oriental (brasil). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 255-272.
- Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamas. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1131-6.
- Pietta P-G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000;63(7):1035-42.
- Pignol, S. Auvin, D. Carré, J.G. Marin, P.E. Chabrier, Calpain inhibitors and antioxidants act synergistically to prevent cell necrosis: Effects of the novel dual inhibitors (cysteine protease inhibitor and antioxidant) BN 82204 and its pro-drug BN 82270, *J. Neurochem.* 98 (2006) 1217–1228. doi:10.1111/j.1471-4159.
- Polke M, Hube B, Jacobsen ID. Chapter Three - *Candida* Survival Strategies. In: Sariaslani S, Gadd GM, editors. *Advances in Applied Microbiology*. 91: Academic Press; 2015. p. 139-235.
- Popovic, M.; Andjelkovic, U.; Grozdanovic, M.; Aleksic, I.; Gavrovic-Jankulovic, M. In Vitro Antibacterial Activity of Cysteine Protease Inhibitor from Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Indian J. Microbiol.* 2012, 53, 100–105.

- Prabhu S., S.R. Dennison, B. Lea, T.J. Snape, I.D. Nicholl, I. Radecka, F. Harris, Anionic antimicrobial and anticancer peptides from plants, *Crit. Rev. Plant Sci.* 32 (2013) 303–320.
- Prado, Héctor Juan; Rizzo, Inés. Actividad antifúngica de extractos vegetales empleados en la Medicina tradicional argentina. 2011. Editorial: Asociación de Química y Farmacia del Uruguay. Revista: Revista de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay. ISSN: 0797-9150. <http://hdl.handle.net/11336/88896>.
- Prathibha, S.; Nambisan, B.; Leelamma, S. Enzyme inhibitors in tuber crops and their thermal stability. *Plant Foods Hum. Nutr.* 1995, 48, 247–257.
- Pukalskas, Audrius and van Beek, Teris A. and Venskutonis, Rimantas P. and Linssen, Jozef P. H. and van Veldhuizen, Albertus and de Groot, Identification of Radical Scavengers in Sweet Grass (*Hierochloa odorata*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 50, number 10, pages 2914-2919, 2002, <https://doi.org/10.1021/jf011016r>.
- Qi, R.-F., Song, Z.-W., & Chi, C.-W. (2005). Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(5), 283–292.
- Quilis J., B. López-García, D. Meynard, E. Guiderdoni, B. San Segundo, Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice, *Plant Biotechnol. J.* 12 (2014) 367–377. doi:10.1111/pbi.12143.
- Quilis J., D. Meynard, L. Vila, F.X. Avilés, E. Guiderdoni, B. San Segundo, A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice, *Plant Biotechnol. J.* 5 (2007) 537–553. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00264.x.
- Quintero CHG. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio.* 2011;14(2S).
- Quiroga E.N., Sampietro D.A., Sgariglia M.A., Soberón J.R., Vattuone M.A., Antimycotic activity of 5'-prenylisoflavanones of the plant *Geoffroea decorticans*, against *Aspergillus* species, *Int. J. Food Microbiol.* 132 (2009) 42–46, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.013>.
- Rashid, F.; Bano, B.; Sharma, S. Unfolding During Urea Denaturation of a Low Molecular Weight Phytocystatin (Thiol Protease Inhibitor) Purified from *Phaseolus mungo* (Urd). *Protein Pept. Lett.* 2006, 13, 323–329.
- Rawlings Neil D, Barrett Alan J, Thomas Paul D, Xiaosong Huang, Alex Bateman, Robert D Finn, The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue D1, 4-1-2018, Pages D624–D632, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D343–D350.

- Reddi, S.; Kapila, R.; Dang, A.K.; Kapila, S. Evaluation of Allergenic Response of Milk Bioactive Peptides Using Mouse Mast Cell. *Milchwissenschaft* 2012, 67, 189–191.
- Reed C.J., Lewis H., Trejo E., Winston V., Evilia C., Protein adaptations in *Archaeal extremophiles*, *Archaea* 2013 (2013), 373275. <https://doi.org/10.1155/2013/373275>.
- Rees D.C., W.N. Lipscomb, Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution., *J. Mol. Biol.* 160 (1982) 475–498.
- Retzl, B.; Hellinger, R.; Muratspahić, E.; Pinto, M. E. F.; Bolzani, V. S.; Gruber, C. W. Discovery of a beetroot protease inhibitor to identify and classify plant-derived cystine Knot peptides. *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 3305– 3314, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00648
- Revina TA, Kladnitskaya GV, Gerasimova NG, Gvozdeva EL, Valueva TA. Protein trypsin inhibitor from potato tubers. *Biochemistry (Mosc.)*. 2010 Jan;75(1):36-40. doi: 10.1134/s0006297910010050. PMID: 20331422.
- Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018 Jun 26;4(3):482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482. PMID: 31294229; PMCID: PMC6604941.
- Reynoso M.A., Vera N., Aristimuño M.E., Daud A, Sánchez Riera A., Antinociceptive activity of fruits extracts and arropes of *Geoffroea decorticans* (chañar), *J. Ethnopharmacol.* 145 (2013) 355–362, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.022>.
- Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnostico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina.* 2006;66:27-32.
- Rocha G.F., M.E. Díaz, A.M. Rosso, M.G. Parisi, Citotoxicidad de una aspartil peptidasa de *Salpichroa organifolia* frente a la infección causada por *Phytophthora capsici* en zapallitos verdes (*Cucurbita maxima*, var. Zapallito), *Cultiv. Trop.* 37 (2016) 111–117. doi:10.13140/RG.2.1.4562.3926.
- Rodríguez-Guerrero, Enrique, et al. systematic review of plasmid AmpC type resistances in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and preliminary proposal of a simplified screening method for ampC. *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no 3, p. 611.
- Rodrigues Macedo M.L., Maria das Graças Machado Freire, Octávio Luiz Franco, Ludovico Migliolo, Caio Fernando Ramalho de Oliveira, Practical and theoretical characterization of Inga laurina Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 158, Issue 2, 2011, Pages 164-172, ISSN 1096-4959, <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.11.005>.
- Rodríguez, Luis Ernesto. "Origen y evolución de la papa cultivada. Una revisión." *Agronomía Colombiana* 28.1 (2010): 9-17.

- Rodríguez, M., & Mendoza, M. D. (2019). Factores de riesgo de diabetes mellitus tipo 2 en población adulta. Barranquilla, Colombia. Revista Colombiana de Endocrinología, Diabetes & Metabolismo, 6(2), 86-91.
- Rogers B.L., J. Pollock, D.G. Klapper, I.J. Griffith, Sequence of the proteinase-inhibitor cystatin homologue from the pollen of *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed) *, 133 (1993) 219–221.
- Rosenthal, P.J. Falcipains and Other Cysteine Proteases of *Malaria Parasites*. Adv. Exp. Med. Biol. 2011, 712, 30–48.
- Ruseler-van Embden J.G.H., L.M.C. van Lieshout, S.A. Smits, I. van Kessel, J.D. Laman, Potato tuber proteins efficiently inhibit human faecal proteolytic activity: implications for treatment of peri-anal dermatitis., Eur. J. Clin. Invest. 34 (2004) 303–311. doi:10.1111/j.1365-2362.2004.01330.x.
- Ryan S.N., W.A. Laing, M.T. McManus, A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit., Phytochemistry. 49 (1998) 957–963.
- Ryan, C.A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 1990, 28, 425–449.
- S. R, P. R, Antimicrobial Activity of a Protease Inhibitor Isolated From the Rhizome of *Curcuma Amada*, Asian J. Pharm. Clin. Res. 10 (2017) 131. doi:10.22159/ajpcr.2017.v10i9.18257.
- Sabotič J., J. Kos, Microbial and fungal protease inhibitors - Current and potential applications, Appl. Microbiol. Biotechnol. 93 (2012) 1351–1375. doi:10.1007/s00253-011-3834-x.
- Sajid, M.; McKerrow, J. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol. Biochem. Parasitol. 2002, 120, 1–21.
- Saleh, B. K., Omer, A., & Teweldemedhin, B. (2018). Medicinal uses and health benefits of chili pepper (*Capsicum spp.*): a review. MOJ Food Process Technol, 6(4), 325-328.
- Salinas, Zoraida Antonia Caballero, et al. "Alteraciones orales asociadas a candida en pacientes oncológicos: Oral disorders associated with candida in oncological patients." Scientia Oral Salutem ISSN 2789-2794 3.2 (2022): 67-78.
- Samaranayaka, A.G.P.; Li-Chan, E.C.Y. Food-Derived Peptidic Antioxidants: A Review of Their Production, Assessment, and Potential Applications. J. Funct. Foods 2011, 3, 229–254.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. Mycoses. 2015;58:2-13.
- Santos, A.; Luz, L.; Pontual, E.; Napoleão, T.; Paiva, P.; Coelho, L. *Moringa oleifera*: Resource Management and Multiuse Life Tree. Adv. Res. 2015, 4, 388–402.
- Satheesh L.S., K. Murugan, Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L .) Voigt ., 49 (2011) 366–374.

- Sato, Claudia Ana, et al. Effects of compounds from *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* juice on blood coagulation and on proteolytic enzymes. *Protein and Peptide Letters*, 2012, vol. 19, no 5, p. 501-508.
- Saur Palmieri, Valentina; Trillo, Cecilia; López, María Laura. Rasgos diagnósticos en frutos y residuos secos de la cocción de chañar (*Geoffroea decorticans*, Fabaceae) para identificar prácticas poscolecta. *Intersecciones en antropología*, 2019, vol. 20, no 2, p. 167-180.
- Schlüter, U.; Benchabane, M.; Munger, A.; Kiggundu, A.; Vorster, J.; Goulet, M.-C.; Cloutier, C.; Michaud, D. Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control: A multitrophic perspective. *J. Exp. Bot.* 2010, 61, 4169–4183.
- Sels J., J. Mathys, B.M.A. De Coninck, B.P.A. Cammue, M.F.C. De Bolle, Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides., *Plant Physiol. Biochem.* PPB. 46 (2008) 941–950. doi:10.1016/j.plaphy.2008.06.011.
- Semanya SS, Potgieter MJ, Erasmus LJC. Indigenous plant species used by Bapedi healers to treat sexually transmitted infections: Their distribution, harvesting, conservation and threats. *South African Journal of Botany*. 2013;87:66-75.
- Shahidi F, Janitha P, Wanasundara P, nutrition. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science*. 1992;32(1):67-103.
- Shami, AM.M., Philip, K. & Muniandy, S. Synergy of antibacterial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected plant mixture. *BMC Complement Altern Med* 13, 360 (2013). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-360>.
- Shamsi T.N., Parveen R., S. Fatima, Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 91 (2016) 1120–1133. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069.
- Shamsi T.N., R. Parveen, A. Ahmad, R.R. Samal, S. Kumar, S. Fatima, Inhibition of gut proteases and development of dengue vector, *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor, *Acta Ecol. Sin.* 38 (2018) 325–328. doi:10.1016/j.chnaes.2018.01.002.
- Shamsi T.N., R. Parveen, S. Afreen, M. Azam, P. Sen, Y. Sharma, Q. Mohd, R. Haque, T. Fatma, Trypsin Inhibitors from *Cajanus cajan* and *Phaseolus limensis* Possess Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial Activity, 0211 (2018). doi:10.1080/19390211.2017.1407383.
- Shamsi T.N., R. Parveen, S. Fatima, Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 91 (2016) 1120–1133. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069.
- Shamsi, B. Bano, Journey of cystatins from being mere thiol protease inhibitors to at heart of many pathological conditions, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 674–693. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.071.

- Shevchenko Andrej, Matthias Wilm, Ole Vorm, and Matthias Mann. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry* 1996 68 (5), 850-858. DOI: 10.1021/ac950914h.
- Shukle R.H., L. Wu, The Role of Protease Inhibitors and Parasitoids on the Population Dynamics of *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae), *Environ. Entomol.* 32 (2003) 488–499. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.3.488>.
- Siddiqui, A.A.; Khaki, P.S.S.; Sohail, A.; Sarwar, T.; Bano, B. Isolation and purification of phytocystatin from almond: Biochemical, biophysical, and immunological characterization. *Cogent Biol.* 2016, 2, 1262489.
- Siddiqui, M.F.; Ahmed, A.; Bano, B. Insight into the biochemical, kinetic and spectroscopic characterization of garlic (*Allium sativum*) phytocystatin: Implication for cardiovascular disease. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 95, 734–742.
- Siddiqui, S.; Siddiqui, M.F.; Khan, S.; Bano, B. Insight into the biochemical characterization of phytocystatin from *Glycine max* and its interaction with Cd⁺² and Ni⁺². *J. Mol. Recognit.* 2019, 32, e2787.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993;215(2):213-9.
- Silva R.G.G., I.M. Vasconcelos, A.J.U.B. Filho, A.F.U. Carvalho, T.M. Souza, D.M.F. Gondim, A.L.N. Varela, J.T.A. Oliveira, Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae, *Ind. Crops Prod.* 70 (2015) 48–55. doi:10.1016/j.indcrop.2015.02.058.
- Sin S., M. Chye, Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*, (2004) 1010–1022. doi:10.1007/s00425-004-1306-6.
- Singh, S. Benjakul, Proteolysis and Its Control Using Protease Inhibitors in Fish and Fish Products: A Review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17 (2018) 496–509. doi:10.1111/1541-4337.12337.
- Siswoyo, T. A., Mardiana, E., Lee, K. O., & Hoshokawa, K. (2011). Isolation and characterization of antioxidant protein fractions from melinjo (*Gnetum gnemon*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5648-5656.
- Sivonova, M.; Tatarkova, Z.; Durackova, Z.; Dobrota, D.; Lehotsky, J.; Matakova, T.; Kaplan, P. Relationship between Antioxidant Potential and Oxidative Damage to Lipids, Proteins and DNA in Aged Rats. *Physiol. Res.* 2007, 56, 757–764.
- Smid, A. Rotter, K. Gruden, J. Brzin, M.B. Gasparic, J. Kos, J. Zel, J. Sabotic, Clitocypin, a fungal cysteine protease inhibitor, exerts its insecticidal effect on Colorado potato beetle larvae by inhibiting their digestive cysteine proteases, *Pestic. Biochem. Physiol.* 122 (2015) 59–66. doi:10.1016/j.jalz.2013.05.1647.

- Sonawane S. K, Arya S. S. Plant Seed Proteins: Chemistry, Technology and Applications. Curr Res Nutr Food Sci 2018;6(2). doi:<http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.6.2.20> este último es de semillas de plantas.
- Song, M. Taylor, K. Baker, R.C.J. Bateman, Inhibition of cysteine proteinases by Carica papaya cystatin produced in *Escherichia coli*., Gene. 162 (1995) 221–224.
- Souza C., Camargo R., Demasi M., Santana J.M., Effects of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Protease Inhibitor on Purified 20S Proteasome and MCF-7 Breast Cancer Cells, 9 (2014) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0086600.
- Sreerama Y.N., Das J.R., Rao D.R., L.R. Gowda, Double-headed trypsin/chymotrypsin inhibitors from horse gram (*Dolichos biflorus*): purification, molecular and kinetic properties, J. Food Biochem. 21 (1997) 461–477, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1997.tb00200.x>.
- Srikanth S., Z. Chen, Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy, 7 (2016). doi:10.3389/fphar.2016.00470.
- Sriket, C. Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention, Int. Food Res. J. 21 (2014) 433–445. ISSN: 22317546.
- Srivastava, P.; Raut, H.N.; Wagh, R.S.; Puntambekar, H.M.; Kulkarni, M.J. Purification and Characterization of an Antioxidant Protein (~16 KDa) from *Terminalia Chebula* Fruit. Food Chem. 2012, 131, 141–148.
- Ștef, D.S. & Gergen, Iosif & Trașcă, Teodor & Hărmănescu, M. & Lavinia, Ștef & Ramona, Biron & Hegheduș, M.G.. (2009). Total antioxidant and radical scavenging capacities for different medicinal herbs. Romanian Biotechnological Letters. 14. 4704-4709.
- Stewart J.T., Ph.D., Flynn W. Warren, M.S., Susan M. Johnson, Janet L. Fox, Pharm.D., June Mullaney, Ph.D., Stability of ceftazidime in plastic syringes and glass vials under various storage conditions, American Journal of Hospital Pharmacy, Volume 49, Issue 11, 1 November 1992, Pages 2765–2768, <https://doi.org/10.1093/ajhp/49.11.2765>
- Stiles ML, Allen LV Jr, Fox JL. Stability of ceftazidime (with arginine) and of cefuroxime sodium in infusion-pump reservoirs. Am J Hosp Pharm. 1992 Nov;49(11):2761-4. PMID: 1471642.
- Stiles ML, Tu YH, Allen LV. Stability of cefazolin sodium, cefoxitin sodium, ceftazidime, and penicillin G sodium in portable pump reservoirs. Am J Hosp Pharm 1989;46:1408–12. 10.1093/ajhp/46.7.1408
- Stoch, S.A.; Wagner, J.A. Cathepsin K Inhibitors: A Novel Target for Osteoporosis Therapy. Clin. Pharmacol. Ther. 2008, 83, 172–176.
- Stotz H.U., F. Waller, K. Wang, Innate immunity in plants: the role of antimicrobial peptides, in: P.S. Hiemstra, S.A.J. Zaat (Eds.), Antimicrobial Peptides and Innate Immunity, Springer, Basel, 2013, pp. 29–51.

- Sun, C.; Tang, X.; Ren, Y.; Wang, E.; Shi, L.; Wu, X.; Wu, H. Novel Antioxidant Peptides Purified from Mulberry (*Morus Atropurpurea* Roxb.) Leaf Protein Hydrolysates with Hemolysis Inhibition Ability and Cellular Antioxidant Activity. J. Agric. Food Chem. 2019, 67, 7650–7659.
- Swathi M., Lokya, V V.. Swaroop Mallikarjuna, N., Kannan M., Dutta-Gupta A., K. Padmasree, Structural and functional characterization of proteinase inhibitors from seeds of *Cajanus cajan* (cv. ICP 7118), Plant Physiol. Biochem. 83 (2014) 77–87, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.009>.
- Tajkarimi M, Ibrahim SA, Cliver D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 2010;21(9):1199-218.
- Tellechea, M.; Garcia-Pardo, J.; Cotabarren, J.; Lufrano, D.; Bakas, L.; Avils, F.; Obregon, W.; Lorenzo, J.; Tanco, S. Micro-plate Assay to Study Carboxypeptidase A Inhibition in Andean Potatoes. Bio-Protocol 2016, 6 (23), 1–12. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2032>.
- Terada, S., Fujimura S., S. Kino, E. Kimoto, Purification and characterization of three proteinase inhibitors from *Canavalia lineata* seeds, Biosci. Biotechnol. Biochem. 58 (1994) 371–375. <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-historyeruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>.
- Thevissen K, François IE, Sijtsma L, van Amerongen A, Schaaper WM, Meloen R, Posthuma-Trumpie T, Broekaert WF, Cammue BP. Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. Peptides. 2005 Jul;26(7):1113-9. doi: 10.1016/j.peptides.2005.01.008. Epub 2005 Feb 16. PMID: 15949628.
- Thevissen, K., Terras, F. R., & Broekaert, W. F. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. Applied and Environmental Microbiology, 65(12), 5451-5458.
- Tiphaine Adam de Beaumais, Lisa Lynqsie Hjalgrim, Jacob Nersting, Joerg Breitreutz, Brigitte Nelken, Martin Schrappe, Martin Stanulla, Caroline Thomas, Yves Bertrand, Guy Leverger, André Baruchel, Kjeld Schmiegelow, Evelyne Jacqz-Aigrain, Evaluation of a pediatric liquid formulation to improve 6-mercaptopurine therapy in children, European Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 83, 2016, Pages 1-7, ISSN 0928-0987, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.002>.
- Thomson J, Bonomo R. The threat of antibiotic resistance in Gram negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril!. Current Opinion in Microbiology 2005;8:518-524
- Torres-Castillo, J. A., Jacobo, C. M., & Blanco-Labra, A. (2009). Characterization of a highly stable trypsin-like proteinase inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (*O. streptacantha* Lemaire). Phytochemistry, 70(11-12), 1374-1381.
- Torres-Fuentes, C.; Contreras, M.D.M.; Recio, I.; Alaiz, M.; Vioque, J. Identification and Characterization of Antioxidant Peptides from Chickpea Protein Hydrolysates. Food Chem. 2015, 180, 194–202.

- Turk V., J. Kos, B. Turk, Turk V, KosJ and Turk B. (2004). Cancer Cell, 5, 409–410, Cancer Cell. 5 (2004) 409–410.
- Twentyman PR; Luscombe M. A Study of Some Variables in a Tetrazolium Dye (MTT) Based Assay for Cell Growth and Chemosensitivity. Br. J. Cancer 1987, 56 (3), 279–285.
- Udvardy, The role of controlled proteolysis in cell-cycle regulation., Eur. J. Biochem. 240 (1996) 307–313. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0307h.x.
- Uma Shankar S., K. Jagdeep, S. Dilip, Antifungal plant defensins: structure–activity relationships, modes of action, and biotech applications, in: Small Wonders: Peptides for Disease Control, American Chemical Society, 2012, pp. 317–336.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2007, 39, 44–84.
- Valueva T.A., V. V. Mosolov, Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms, Biochem. 69 (2004) 1305–1309. doi:10.1007/s10541-005-0015-5.
- Van Der Weerden N.L., M.R. Bleackley, M.A. Anderson, Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides, Cell. Mol. Life Sci. 70 (2013) 3545–3570.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol. 2006;44:135-62.
- Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. Toxins (Basel). 2013 Apr 29;5(5):895-911. doi: 10.3390/toxins5050895. PMID: 23628786; PMCID: PMC3709268.
- Van Vuuren S, Naidoo D. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. Journal of Ethnopharmacology. 2010;130(3):552-8.
- Vasiljeva, O.; Reinheckel, T.; Peters, C.; Turk, D.; Turk, V.; Turk, B. Emerging Roles of Cysteine Cathepsins in Disease and their Potential as Drug Targets. Curr. Pharm. Des. 2007, 13, 387–403.
- Velastegui, Manuel A. León, Natalia A. Gavilanes Bayas, and Edwin X. Mejía Navas. "Lesiones de la mucosa oral asociadas al uso de prótesis odontológicas en pacientes edéntulos totales." Dominio de las Ciencias 5.1 (2019): 603-623.
- Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud Pública de México. 2005;47(5):381-7.
- Victor, V.M.; Rocha, M. Targeting Antioxidants to Mitochondria: A Potential New Therapeutic Strategy for Cardiovascular Diseases. Curr. Pharm. Des. 2007, 13, 845–863.

- Volcy C. Genesis and evolution of Koch postulates and their relationship with phytopathology. A review. *Agronomía Colombiana*. 2008;26(1):107-15.
- Waldron, L.M. Wegrich, P.A. Merlo, T.A. Walsh, Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor., *Plant Mol. Biol.* 23 (1993) 801–812.
- Walsh T.A., J.A. Strickland, Proteolysis of the 85-kilodalton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains., *Plant Physiol.* 103 (1993) 1227–1234.
- Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* 36, 1136–1145 (2018). <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>.
- Wayne, P.A., Clinical and Laboratory Standards Institute. PA 19087, 1999, https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf
- Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D1087-93. doi: 10.1093/nar/gkv1278. Epub 2015 Nov 23. PMID: 26602694; PMCID: PMC4702905.
- Wang, Mian-Ying, et al. "*Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research." *Acta Pharmacologica Sinica* 23.12 (2002): 1127-1141.
- Wang Z., G. Wang, APD: the antimicrobial peptide database, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D590–D592.
- Ward O.P., M.B. Rao, A. Kulkarni, Proteases, Production, *Encycl. Microbiol.* (2009) 495–511.
- Woloshuk, C. P., Meulenhoff, J. S., Sela-Buurlage, M., Van den Elzen, P. J., & Cornelissen, B. J. (1991). Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, 3(6), 619-628.
- Wong J.H., L. Xia, T.B. Ng, A review of defensins of diverse origins, *Curr. Protein Peptide Sci.* 8 (2007) 446–459.
- Wong, F.C.; Xiao, J.; Wang, S.; Ee, K.Y.; Chai, T.T. Advances on the Antioxidant Peptides from Edible Plant Sources. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 99, 44–57.
- Wood, R. S Hogg, B. Yip, M. V O'Shaughnessy, J. S.G. Montaner, CD4 Cell Count Response to Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor- or Protease Inhibitor-Based Highly Active Antiretroviral Therapy in an Observational Cohort Study, 2003. doi:10.1097/00126334-200311010-00016.
- World Health Organization WHO. Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006-2015: breaking the chain of transmission. Geneva: Organización Mundial de la Salud; 2007.

- Wu, C., Whitaker J.R., Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*, var. linden), J. Agric. Food Chem. 38 (1990) 1523–1529, <https://doi.org/10.1021/jf00097a021>.
- Xiao J., H. Zhang, L. Niu, X. Wang, Efficient screening of a novel antimicrobial peptide from *Jatropha curcas* by cell membrane affinity chromatography, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 1145–1151.
- Xu Z.F., W.Q. Qi, X.Z. Ouyang, E. Yeung, M.L. Chye, A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem., Plant Mol. Biol. 47 (2001) 727–738.
- Yili, A.; Ma, Q.L.; Gao, Y.H.; Zhao, B.; Jun, D.; Aisa, H.A. Isolation of Two Antioxidant Peptides from Seeds of *Apium Graveolens* Indigen
- ous to China. Chem. Nat. Compd. 2012, 48, 719–720.
- Yount N.Y., M.R. Yeaman, Immunocontinuum: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance, Protein Pep. Lett. 12 (2005) 49–67.
- Yount N.Y., M.R. Yeaman, Multidimensional signatures in antimicrobial peptides, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2004) 7363–7368.
- Yount N.Y., M.R. Yeaman, Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1277 (2013) 127–138.
- Yoza K. I., S. Nakamura, M. Yaguchi, K. Haraguchi, K.-I. Ohtsubo, Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor, cystatin, from Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. Ma-yuen Stapf), Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 (2002) 2287–2291.
- Yu, Yin Y., Zhao W., Yu Y., Liu B., Liu J., Chen F., Novel peptides derived from Z. egg white protein inhibiting alpha-glucosidase, Food Chem. 129 (2011) 1376–1382, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.067>.
- Zasloff M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature 415 (2002) 389–395.
- Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Curth, U.; Drosten, C.; Sauerhering, L.; Becker, S.; Rox, K.; Hilgenfeld, R. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. Science 2020, 368, 409–412.
- Zhao Y. R., Y.-H. Xu, H.-S. Jiang, S. Xu, X.-F. Zhao, J.-X. Wang, Antibacterial activity of serine protease inhibitor 1 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*, Dev. Comp. Immunol. 44 (2014) 261–269. doi:10.1016/j.dci.2014.01.002.
- Zhu-Salzman K., R. Zeng, Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors, Annu. Rev. Entomol. 60 (2015) 233–252. doi:10.1530/REP-16-0083.
- Zou, T.B.; He, T.P.; Li, H.B.; Tang, H.W.; Xia, E.Q. The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. Molecules 2016, 21, 72.

Anexo I

**Metodología de preparación de los Extractos
Crudos y Tratamientos Térmicos de las ocho
especies seleccionadas**

Preparación de los extractos de Morrón (*Capsicum annuum*).

- 1) Se pesa 30 g de semilla y se enjuaga con agua destilada.
- 2) Se procesa con 100 mL de buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4.
- 3) Se incuba 3 horas a 120 rpm.
- 4) Se filtra con gasa.
- 5) Se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C.
- 6) Se colecta el sobrenadante al que denominamos MAEC.
- 7) Se realiza tratamiento térmico a 100°C en baño de agua durante 5 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C. Se colecta el sobrenadante al que denominamos MATT.

Preparación de los extractos de Morinda (*Morinda citrifolia*).

- 1) Se pesa 30 g de semilla y se enjuaga con agua destilada.
- 2) Se procesa con 450 mL de buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4.
- 3) Se incuba 2 horas a 150 rpm.
- 4) Se filtra con gasa.
- 5) Se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C.
- 6) Se colecta el sobrenadante al que denominamos MoEC.
- 7) Se realiza tratamiento térmico a 90 °C en bloque seco durante 30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C. Se colecta el sobrenadante al que denominamos MoTT.

Preparación de los extractos crudo de Chía (*Salvia hispanica*).

En las últimas décadas los procesos industriales para la obtención de aceites a base de semillas han cobrado gran importancia en el mercado, generando como producto secundario del proceso de extrusado-prensado en frío una masa compacta denominada expeller. En el caso de la chía el expeller obtenido mediante el procesamiento de semillas es empleado como alimento balanceado para el ganado. Si bien el estudio de las ventajas nutricionales que otorga la incorporación de semillas de chía en la dieta humana se encuentra en auge, no se presentan hasta la fecha investigaciones para la reutilización del expeller producto del procesamiento industrial.

Para la preparación del extracto, el material de partida fue expeller de chía:

- 1) Se pesan 10 g de expeller.
- 2) Se procesan con 250 mL de buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4.
- 3) Se incuban 1 hora a 200 rpm y temperatura ambiente.
- 4) Se filtran con gasa.
- 5) Se centrifugan 60 min a 6000 g y 4°C.
- 6) Se colecta el sobrenadante al que denominamos ShEC.
- 7) Se realiza un tratamiento térmico a 90 °C en bloque seco durante 30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C. Se colecta el sobrenadante al que denominamos ShTT.

Preparación de los extractos de Chañar (*Geoffroea decorticans*).

Las semillas se obtienen colectando los frutos directamente desde los árboles. Un kilo de frutos contiene aproximadamente 250 unidades y un equivalente a 625 g de semillas, por lo tanto, de un kilo de semilla limpia se obtienen aproximadamente 400 unidades. Para separar el endocarpio con la semilla desde la pulpa, los frutos se deben remojar en agua durante dos a tres días, realizando fricción manual y eliminando la pulpa en forma periódica hasta obtener los carozos limpios.

- 1) Se pesan 20 g de semilla y enjuago con agua destilada.
- 2) Se procesan con 200 mL de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5.
- 3) Se incuban 2 horas a 140 rpm y 4 °C.
- 4) Se filtran con gasa.
- 5) Se centrifugan 30 min a 6000 g y 4°C.
- 6) Se colectan el sobrenadante al que denominamos GdEC.
- 7) Se realiza un tratamiento térmico a 90 °C en bloque seco durante 30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C. Se colecta el sobrenadante al que denominamos GdTT.

Preparación de los extractos de Moringa (*Moringa oleifera*).

Las semillas de *M. citrifolia* se recolectaron a mano de árboles locales cerca del barrio La Coronela, La Habana, Cuba. Las semillas se lavaron y almacenaron a -80 °C.

- 1) Se pesa 30 g de semillas y enjuago con agua destilada.

2) Se procesa con 450 mL de buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4.

3) Se incuba 2 horas a 120 rpm y 4°C.

4) Se filtra con gasa.

5) Se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C.

6) Se colecta el sobrenadante al que denominamos MdEC.

7) Se realiza tratamiento térmico a 90°C en bloque seco durante 30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C. Se colecta el sobrenadante al que denominamos MdTT.

Preparación de los extractos de Canola (*Brassica napus*).

El aceite de canola es muy solicitado en varios países debido a su bajo porcentaje de grasas saturadas. La harina de canola es el subproducto del procesamiento del expeller de canola y se utiliza, mayoritariamente, como ingrediente de los piensos de alto valor proteico de las raciones de aves de corral, cerdos, ganado y peces.

1) Se pesa 30 g de expeller de canola.

2) Se procesa con 250 mL de buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4.

3) Se incuba 1 hora a 120 rpm y 4°C.

4) Se filtra con gasa.

5) Se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C.

6) Se colecta el sobrenadante al que denominamos BnEC.

7) Se realiza tratamiento térmico a 90°C en bloque seco durante 30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C. Se colecta el sobrenadante al que denominamos BnTT.

Preparación de los extractos de Papa (*Solanum tuberosum*).

En el caso de la papa, hemos optado trabajar directamente con los tubérculos.

1) Se pesa 370 g de papa congelada, se retira la cáscara y se corta en pequeños trozos.

2) Se procesa con 600 mL de agua destilada.

3) Se incuba 1 hora a 120 rpm y 4°C.

4) Se filtro con gasa.

5) Se centrifugo 30 min a 6000 g y 4°C.

6) Se colecta el sobrenadante al que denominamos StEC.

7) Se realiza tratamiento térmico a 90°C en bloque seco durante 30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C. Se colecta el sobrenadante al que denominamos StTT.

Preparación de los extractos de Quinoa (*Chenopodium quinoa*).

- 1) Se pesa 30 g de semilla y enjuago con agua destilada.
- 2) Se procesa con 200 mL de buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4.
- 3) se incuba 1 hora a 120 rpm y 4 °C.
- 4) Se filtra con gasa.
- 5) Se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C.
- 6) Se colecta el sobrenadante al que denominamos QEC.

7) Se realiza tratamiento térmico a 90°C en bloque seco durante 30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifuga 30 min a 6000 g y 4°C. Se colecta el sobrenadante al que denominamos QTT.

Anexo II

Cuantificación de Proteínas totales.

Método de Bradford.

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 10-1000 µg/mL. Los volúmenes fueron adaptados para la lectura de absorbancia en placa de 96 pocillos (Lector de placas Tecan Infinite 200 Pro). Se realizó el blanco correspondiente utilizando el reactivo de Bradford. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, con la estimación de la desviación estándar correspondiente.

MEZCLA DE REACCIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN POR BRADFORD	
Muestra	5 µl
Reactivo de Bradford	250 µl
Incubación de 10 min a	25 °C
Lectura de absorbancia a	595 nm

Tabla AII.1: Mezcla de reacción para la cuantificación por el método de Bradford.

Método de Lowry.

Este método se basa en 2 etapas según las siguientes reacciones que generan productos coloreados:

1) Bajo condiciones alcalinas, como se representa en la Figura AII.1, el ion Cobre⁺² (Cu⁺²) forma un complejo color azul-púrpura con los enlaces peptídicos de las proteínas, específicamente con los átomos de nitrógeno de los mismos, y se reduce parcialmente a Cu⁺¹. A esta reacción se la denomina Reacción de Biuret y es independiente de la composición de la proteína, por lo que, por sí sola es poco sensible.

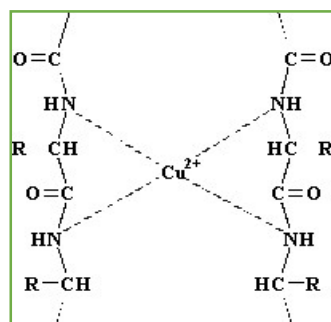


Figura AII.1, se adiciona el reactivo de Folin-Ciocalteu cuyo principal constituyente es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que, al ser reducido por reacción con los grupos fenólicos presentes en los residuos de Tirosina, Triptófano y Cisteína de las proteínas; da lugar a un complejo de color azul intenso. El Cu⁺ formado en la reacción anterior cataliza el proceso de reducción. El reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona en 2

etapas: la primera, rápida, genera un producto inestable que finalmente se reduce, en la fase posterior lenta, a azul de molibdeno/tungsteno; generando un cambio en el color de la muestra que puede ser cuantificado determinando la absorbancia a 700 nm.

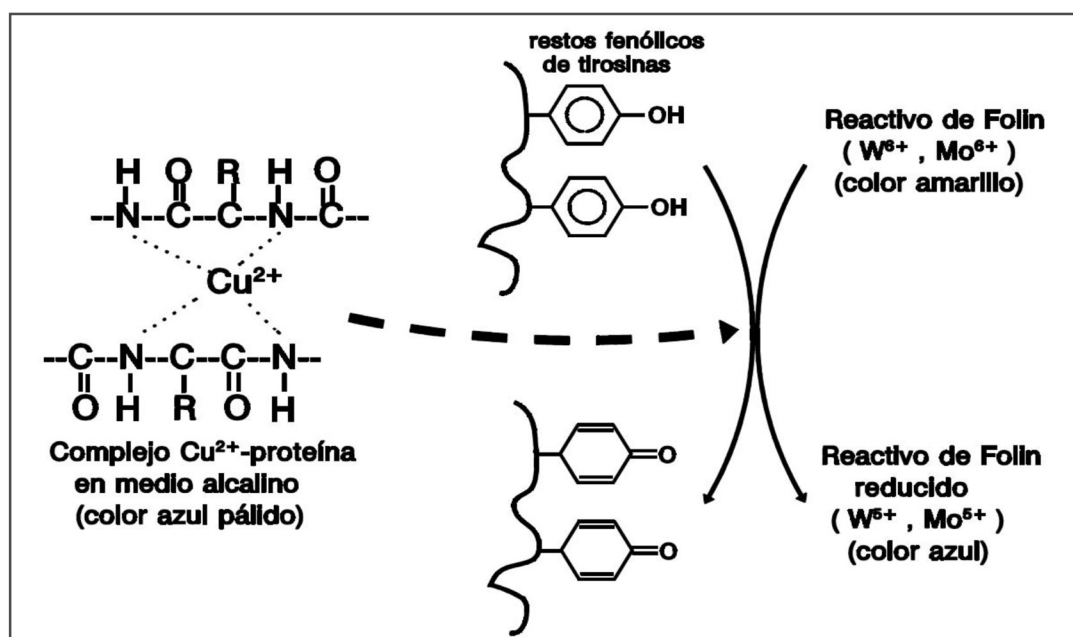


Figura All.2: Reacción entre el reactivo de Folin-Ciocalteu y los grupos fenólicos de los residuos de tirosina provenientes del complejo formado entre el Cu^{+2} proteína en la etapa previa. El ácido fosfomolibdotúngstico componente del reactivo al que debe su color amarillo, se reduce y da lugar a la aparición de un color azul intenso.

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar en el rango de 10-1000 $\mu\text{g/mL}$. Los volúmenes fueron adaptados para la lectura de absorbancia en placa de 96 pocillos (Lector de placas Tecan InfiniteM200 Pro). Se realizó el blanco correspondiente utilizando agua destilada estéril. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, con la estimación de la desviación estándar correspondiente.

Mezcla de reacción para cuantificación proteica por Lowry:

Muestra/ Estándar/ AD	c.s.p. para el control 20 μl
Reactivo C: 50 ml A (Na_2CO_3 2% P/V en NaOH 0.1 M) + 1ml B (CuSO_4 0,5% P/V en tartrato de sodio y potasio 1% P/V)	100 μl
Incubación	10 minutos a 25°C
Reactivo D: Folin diluido 1/2 con AD	c.s.p. 10 μl
Incubación	30 minutos a 25°C
Transferir a placa Greiner 96 U Transparent	120 μl
Lectura de absorbancia	700 nm

Tabla 2.3.2. Mezcla de reacción para la cuantificación proteica por el método de Lowry.

Anexo III

Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-PAGE.

Los EPVs se resuspendieron en buffer de muestra 6X para electroforesis y se llevó a ebullición durante 5 min.

Preparación de buffer de muestra 6X.

BUFFER DE MUESTRA 6X	
Tris	9,42 g
SDS	12 g
Mercaptoetanol	30 ml
Glicerol	48 ml
Azul de Bromofenol	12 mg
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M	
AD, c.s.p.	100ml

Preparación de los geles.

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III Bio-Rad. La composición de los buffers y de los geles se indica a continuación:

Preparación de buffer del gel.

BUFFER DE GEL	
Tris	36,3 g
SDS	0,3 g
Llevar a pH 8,45 con HCl 1 M	
AD, c.s.p.	100ml

Preparación de gel de apilamiento.

GEL DE APILAMIENTO (4% T, 3% C)	
Acril-Bis (49,5:3)	0,4 ml
Buffer del gel	1,250 ml
AD	3,4 ml
PSA 10%	0,04 ml
TEMED	0,007 ml
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M	
AD, c.s.p.	100ml

Preparación de gel de resolución.

GEL DE RESOLUCIÓN (16,5% T, 3% C)	
Acril-Bis (49,5:3)	3,3 ml
Buffer del gel	3,3 ml
AD c.s.p.	3,4 ml
Persulfato de amonio al 10%	0,04 ml
TEMED	0,007 ml

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida.

Se sembraron las muestras en las calles correspondientes. En los reservorios anódico y catódico de la celda Miniprotean III Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

Tabla AIII.1 Preparación de buffer anódico 2M.

BUFFER ANÓDICO 2M	
Tris	24,2 g
Llevar a pH 8,9 con HCl 1 M	
AD, c.s.p.	1000ml

Tabla AIII.2 Preparación de buffer catódico 1M.

BUFFER CATÓDICO 1M	
Tris	12,1 g
Tricina 0,1 M	17,9 g
SDS 0,1%	1 g
AD, c.s.p.	1000 ml

Las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V) durante el apilado, luego se aumentó lentamente hasta 105 V al ingresar las proteínas al gel espaciador, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

Fijación y Tinción.

Finalizada la electroforesis, se fijaron los geles en solución fijadora durante 30 min (los péptidos no se fijan completamente, pueden difundir si no se respetan los tiempos; y se recomienda un máximo de fijación de 45 minutos) y teñidos por inmersión en solución colorante durante una hora (se recomienda un máximo de coloración de una hora y media). Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con solución decolorante para eliminar la coloración de fondo. Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda.

Tabla AIII.2 *Preparación de solución fijadora.*

SOLUCION FIJADORA	
Ácido acético glacial	1100 ml
Metanol	400 ml
AD, c.s.p.	1000 ml

Tabla AIII.3 *Preparación de solución colorante.*

SOLUCION COLORANTE	
Ácido acético glacial	100 ml
Coomassie brilliant blue R-250	250 mg
AD, c.s.p.	1000 ml

Tabla AIII.4 *Preparación de solución decolorante.*

SOLUCION DECOLORANTE	
Ácido acético glacial	100 ml
AD, c.s.p.	1000 ml

2.6.10. *Tinción de plata. (Schevchenko, A. et al, 1996)*

1. Fijar el gel en metanol 50 % y ácido acético 5 % durante 20 min.
2. Lavar el gel en metanol 50 % durante 10 min.
3. Lavar el gel en H₂O Milli-Q durante al menos 2 horas (El lavado durante toda la noche es mejor porque reduce el fondo en la tinción).
4. Sensibilizar el gel en Na₂S₂O₃ al 0,02 % durante 1 min.
5. Lavar el gel 2 veces en H₂O durante 1 min. cada vez.
6. Incubar el gel en AgNO₃ al 0,1% durante 20 min. a 4°C
7. Lavar el gel en H₂O durante 1 min.
8. Transferir el gel a un contenedor limpio.
9. Lavar el gel en H₂O durante 1 min.
10. Revelar el gel en formalina (35% formaldehído) al 0,04 % y Na₂CO₃ al 2 %.
11. Cambiar la solución de revelado cuando el revelador cambie a amarillo.
12. Parar la tinción con acético al 5 %.
13. Cambiar la solución de acético al 5 % al menos 2 veces.
14. Guardar el gel at 4° C en acético al 1 %.

Anexo IV

Suspensiones antibióticas

Preparación de la suspensión de antibiótico:

En una primera instancia, se ha molido un disco de antibiótico en mortero y luego se lo ha resuspendido en 2 mL de H₂O destilada y autoclavada. A continuación, se pasa por vórtex durante 30 segundos. Luego se centrifugó por 5 minutos a 6000 g, a 25°C y finalmente se recupera el sobrenadante y se desecha el precipitado.

En una segunda instancia y para reducir las variables en la preparación de la suspensión de antibióticos, se han molido en mortero dos monodiscos de antibiótico, luego se disolvieron con 4mL de H₂O destilada (a 25°C), previamente autoclavada, y agitando en vortex posteriormente 30 s. Luego se centrifugó 30 min a 6000 g, a 25 ° C y finalmente se extrae el sobrenadante y se desecha el precipitado. El sobrenadante fue alicuotado en eppendorfs y se almacenó a -80°C.

Pese a que en la bibliografía se ha encontrado varios estudios que demuestran un alto grado de estabilidad de los antibióticos cuando se almacenan a -80 °C, con pérdida de actividad menor al 10 % luego de 4 meses de conservación (1, 2, 3, 4), se propone la realización de testeos de estabilidad para verificar la actividad del mismo. Con estas alícuotas conservadas y preparando resuspendidos nuevos antes de cada experimento, se plantea estudiar la estabilidad midiendo la inhibición del crecimiento bacteriano alcanzado en ambos casos, en cada semana de testeo, comparando los resultados entre sí (Tiphaine et al., 2016; Stiles et. al., 1992; Stiles et. al., 1989; Stewart et. al., 1992).