

EXTRACTOS CRUDOS

Características generales

El contenido de proteínas del extracto crudo obtenido a partir del látex de los frutos de *Araujia angustifolia* fue de 1,5 mg/ml y de 5,4 mg/ml para el de *Araujia hortorum*.

Empleando las técnicas mencionadas en Materiales y Métodos se pudieron detectar varias actividades hidrolíticas en los extractos crudos estudiados. Ambos extractos mostraron actividad proteásica, amidásica, esterásica, poligalacturonidásica y pectinmetilesterásica. Con los métodos empleados no exhibieron actividades ramnogalacturonidásica, xilanásica, metilcelulásica y carboxipeptidásica.

La principal actividad catalítica observada fue la proteolítica. Para conocer el intervalo de tiempo en que se mantenía una correlación lineal entre velocidad de reacción y tiempo se realizaron estudios de las velocidades iniciales, utilizando caseína como sustrato. Se observó que hasta los 5 min de reacción existía una elevada correlación.

Los incrementos en las concentraciones de cisteína agregada a la mezcla de reacción aumentaron la actividad proteolítica de los extractos, lográndose la máxima actividad en presencia de cisteína 12 mM. Mediante el agregado de este activador se obtuvieron valores de actividad enzimática de hasta 4 veces superiores. Se debe tener en cuenta que los extractos originales se prepararon en buffer conteniendo cisteína 5 mM, para lograr un ambiente reductor o protector en el medio y evitar la oxidación de cualquier componente estructural de la enzima. De esta manera, el agregado de cisteína tiene un doble efecto: a bajas concentraciones logra un ambiente protector y a elevadas concentraciones produce un aumento de la eficiencia catalítica. Los resultados obtenidos con el agregado de cisteína constituyen un indicio de que estas proteasas deben ser del tipo cisteínicas. Resultados similares fueron obtenidos en presencia de DTT y β mercaptoetanol.

El buffer de extracción también contuvo EDTA 5 mM, componente que se agrega corrientemente a los buffers utilizados para probar actividad proteolítica sobre caseína de extractos crudos o parcialmente purificados. La función del EDTA es secuestrar metales que puedan presentes en los extractos vegetales que aún no han podido ser removidos y que pueden interferir en la actividad de estas peptidasas. Los metales pesados pueden inhibir a las endopeptidasas cisteínicas por formación de mercáptidos (Storey & Wagner, 1986).

La actividad proteolítica disminuyó en un 95% para ambas muestras cuando se agregaron iodoacetato o E-64 (inhibidores típicos de proteasas cisteínicas) luego de 15 min de incubación. Se demostró que la inhibición fue irreversible, pues la adición de cisteína no fue capaz de revertirla, tanto si se adiciona en el momento de iniciar la incubación con el ácido iodoacético o con el E 64, como después de 30 min de incubación (Fig. 1).

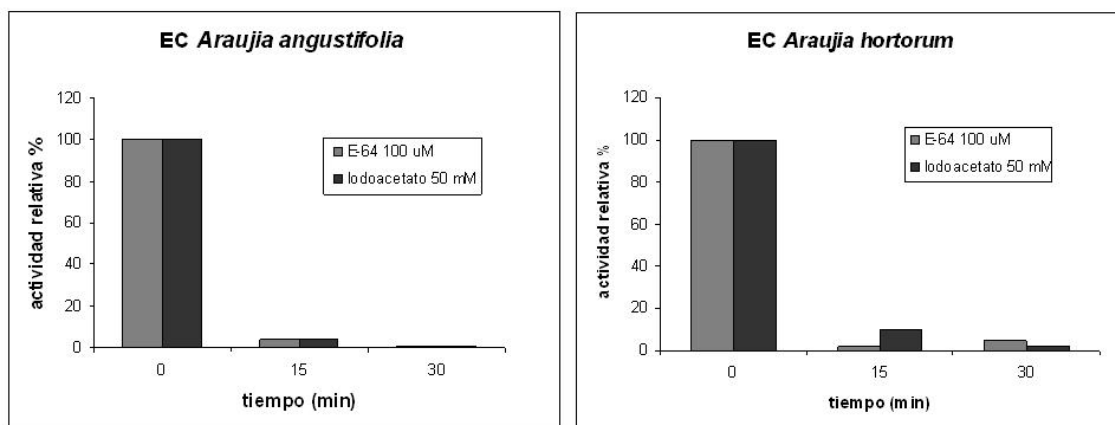


Figura 1. Inhibición de los EC de *Araujia angustifolia* y *A. hortorum* empleando inhibidores específicos de proteasas cisteínicas

Los análisis de inactivación con HgCl_2 , inhibidor reversible de endopeptidasas cisteínicas por formación de mercáptidos, confirmaron la naturaleza cisteínica de las proteasas presentes en los extractos crudos. En presencia de este inhibidor se produce una inhibición total con todas las concentraciones ensayadas, que resultó revertida por el agregado de cisteína

luego de 30 min de incubación frente al inhibidor. Si se adiciona cisteína previamente al agregado del inhibidor la inhibición no tiene lugar.

En consecuencia, la activación por parte de la cisteína y los resultados de inhibición indican una dependencia de la actividad de la/s enzimas de la presencia de los grupos SH- en el sitio activo. Esta conducta se demostró previamente para otras proteasas de la familia *Asclepiadaceae* (Lynn *et al.*, 1980a; Abraham & Joshi, 1979b; Tablero *et al.*, 1991, Arribére *et al.*, 1998, Arribére *et al.*, 1999).

Puesto que el mecanismo catalítico de las peptidasas cisteínicas utiliza cisteína como donador de protones, es característica la activación catalítica por tioles de bajo peso molecular (Storey & Wagner, 1986; Beynon & Bond, 2001; Barrett *et al.*, 1982). La activación puede ser lenta, pero el incremento de la actividad proteolítica de ambos extractos causado por estos agentes reductores es realmente notable. El ditiotreitól (DTT), el β - mercaptoetanol y la cisteína son agentes que han sido utilizados a lo largo de este estudio para obtener un incremento de la actividad proteolítica y que utilizados en concentraciones saturantes de 12,5 mM han logrado aumentar notoriamente la actividad enzimática. Debe destacarse que Storey & Wagner (1986) reportan que estos compuestos tiólicos pueden ejercer un efecto desestabilizador a altas concentraciones (mayores a 5 mM), hecho que Sluyterman & Wijdenes (1972) asocian con un incremento de la autólisis o autodigestión enzimática. Para evitar este efecto es necesario trabajar a bajas temperaturas durante la extracción, aislamiento y purificación de las muestras.

La Fig. 2 muestra el perfil electroforético de los extractos crudos de *A. angustifolia* y *A. hortorum* con y sin inhibidor (iodoacetato de sodio). Se observa que el tratamiento de las muestras influye en los resultados obtenidos. El calentamiento de las muestras en presencia de β -mercaptoetanol genera productos de degradación provocados por la actividad enzimática en el medio reductor cuando los extractos crudos no son inhibidos previamente. Por esta razón las muestras fueron inhibidas antes de la realización de las electroforesis (SDS PAGE).

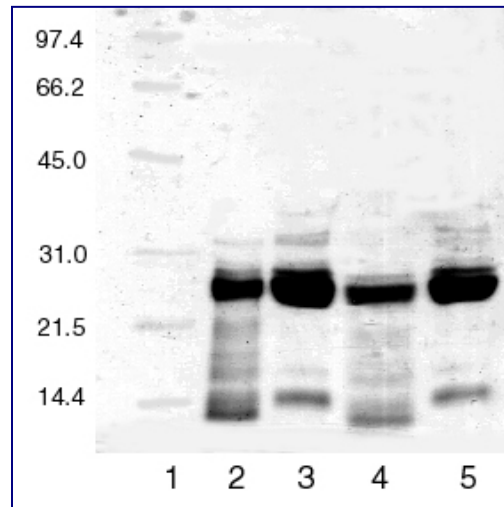


Figura 2. SDS-PAGE de los Extractos Crudos. Calle 1: Marcadores de peso molecular (Bio Rad): Fosforilasa b (97,4 kD), Seroalbúmina bovina (66,2 kD), Ovalbúmina (45,0 kD), Anhidrasa carbónica (31,0 kD), Inhibidor de tripsina (21,5 kD) y Lisozima (14,4 kD); Calle 2: Extracto crudo de *Araujia angustifolia* sin inhibir; Calle 3: Extracto crudo de *Araujia angustifolia* inhibida; Calle 4: Extracto crudo de *Araujia hortorum* sin inhibir; Calle 5: Extracto crudo de *Araujia hortorum* inhibida,

Cuando se examinó la actividad peptidásica de ambas preparaciones crudas en función del pH (Fig. 3), la de *Araujia angustifolia* mostró la máxima actividad (superior al 95%) entre pH 6,7 y 8,5, en tanto que la de *Araujia hortorum* lo hizo a valores de pH ligeramente mayores (7,5-8,5).

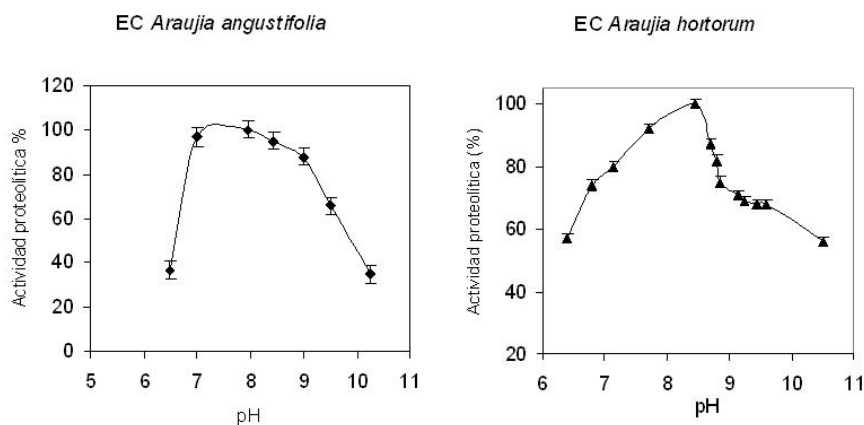


Figura 3. pH óptimo de los extractos crudos.

Este comportamiento es característico de las endopeptidasas cisteínicas de la familia C1, que exhiben perfiles de actividad en función del pH relativamente amplios y un valor de pH óptimo cercano al pH neutro frente a sustratos sintéticos y proteicos (Rowan & Buttle, 1994; Barrett *et al.* 2004).

El efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de los extractos crudos fue ensayado en ausencia (estabilidad) y presencia (efecto térmico) de sustrato.

Los resultados de estabilidad térmica se muestran en la Fig. 4

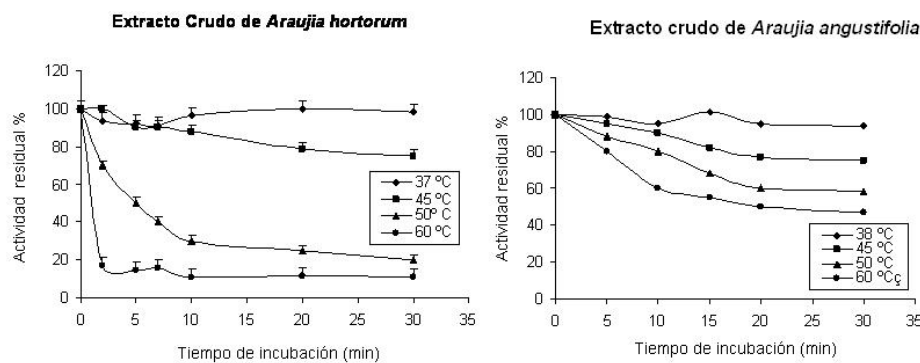


Figura 4. Estabilidad térmica de los extractos crudos.

Los dos extractivos mostraron una buena estabilidad térmica, perdiéndose sólo alrededor de un 20% de la actividad inicial luego de 30 minutos de incubación a 45° C en ambos casos. Sin embargo, el EC de *A. angustifolia* resulta más estable aún a elevadas temperaturas, manteniendo hasta un 50% de la actividad inicial luego de 30 minutos de incubación a 50°C y 60°C.

Los resultados del efecto térmico se muestran en la Fig. 5

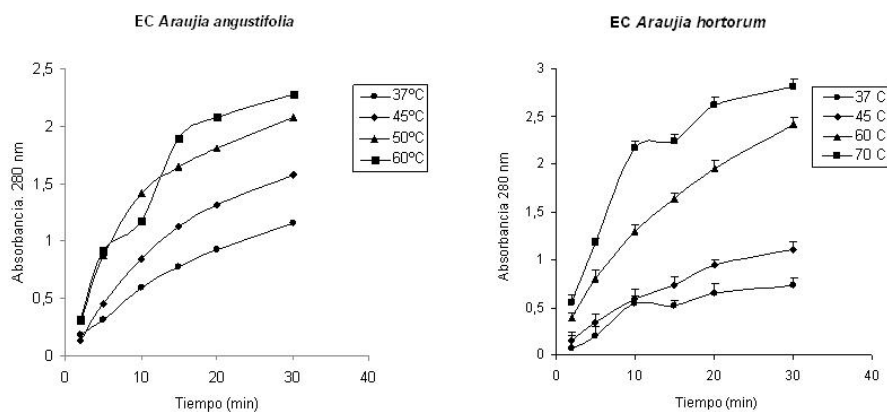


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre los EC en presencia de sustratos.

En presencia de un sustrato como caseína, la actividad enzimática aumenta en función del tiempo con la temperatura, llegando a un máximo de actividad en ambos extractos a los 60°C. Por encima de dichas temperaturas, entre los 70°C y 80°C, ambos extractos pierden rápidamente su actividad caseinolítica, posiblemente debido a un proceso de desnaturalización proteica y no debido a autólisis. Este comportamiento con la temperatura en presencia y ausencia de sustrato indicaría un rol protector por parte del sustrato.

La elevada actividad a temperaturas relativamente altas es otra característica común a las endopeptidasas cisteínicas de la familia C1 (Rowan & Buttle 1994, Barrett *et al.* 2004). Esto favorece el empleo de estos extractivos en procesos que necesitan realizarse a elevadas temperaturas, lo que constituye una propiedad útil adicional a su considerable actividad proteolítica y a la abundancia natural del material vegetal del que provienen.

La actividad de los extractos también se ensayó sobre sustratos sintéticos. En primer término se utilizó PFLNA, un sustrato cromogénico conveniente para ensayar endopeptidasas cisteínicas del tipo de la papaína, que es hidrolizado liberando *p*-nitroanilina, estimada espectrofotométricamente a 410 nm. El residuo fenilalanina en posición S₂ del PFLNA posee los requisitos de especificidad de muchas tiol-proteinasas.

En segundo término se probó la actividad endoesterolítica de los extractos crudos frente a N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de los aminoácidos más comúnmente empleados para este tipo de peptidasas, tales como los derivados de glutamina, alanina y ácido aspártico. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2, donde puede observarse que ambos extractos son activos frente a dichos sustratos.

Extracto crudo	Actividad proteásica (U _{CAS})	Actividad amidásica (U _{PFLNA})	Actividad esterásica (U _{CBZ})		
			Gln	Ala	Asp
<i>Araujia angustifolia</i>	27,5	31,63	33,9	15,5	9,55
<i>Araujia hortorum</i>	34,0	38,78	53,31	2,67	24,95

Tabla 2. Actividad proteásica, amidásica, esterásica de los extractos crudos

Cuando los extractos fueron analizados por isoelectroenfoque seguido de zimograma (Fig. 6), exhibieron varios componentes dentro del rango de pI alcalino, la mayoría de ellos proteolíticamente activos. Los valores de pI obtenidos para los EC de *A. angustifolia* y *A. hortorum* fueron del orden de 8,5, 8,9 y superior a 9,3. Esta naturaleza básica también se observó en las proteasas aisladas del látex de *Asclepias glaucescens* y en las de *Morrenia brachystephana* (Arribére *et al.*, 1998; Vairo Cavalli *et al.*, 2001; Vairo Cavalli *et al.*, 2003, *Morrenia odorata* (Arribére *et al.*, 1999; Vairo Cavalli *et al.*, 2001), *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001), *Araujia angustifolia* (Obregón *et al.*, 2006), *Asclepias fruticosa* (Trejo *et al.*, 2001), *Funastrum clausum* (Morcelle *et al.*, 2004a y b), *Asclepias curassavica* (Liggieri *et al.*, 2004) y *Philibertia gilliessi* (Sequeiros *et al.*, 2005)

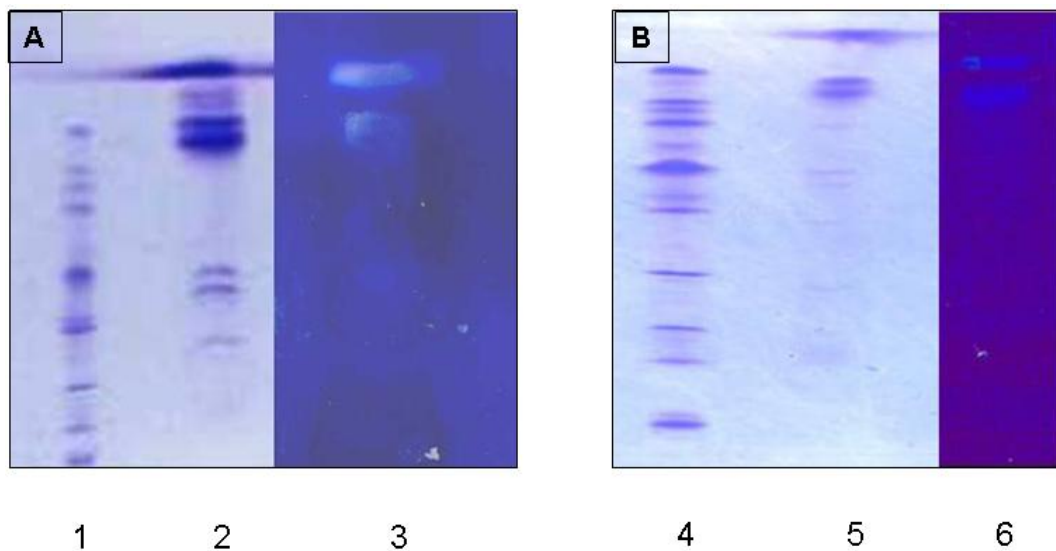


Figura 6. IEF-Zimograma de Extractos crudos. A) *Araujia angustifolia*. B) *Araujia hortorum*. Calles 1 y 4: patrones de IEF; calles 2 y 5: EC; calles 3 y 6: zimogramas.

En base de estos resultados, en ambos casos se seleccionó la cromatografía de intercambio catiónico como estrategia de purificación para las proteasas presentes en los extractos crudos.