



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

“Enzimas vegetales para una producción de cuero eco-compatible”

TESINISTA

Díaz Merino, Matías Ezequiel

DIRECTOR

Dr. Llerena Suster, Carlos

CO-DIRECTORA

Dra. Errasti, María Eugenia

2019

Marzo de 2019 - La Plata, Buenos Aires, Argentina

El presente trabajo para optar al título de Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CiProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, y en el Centro de Investigación en Tecnología del Cuero (CITEC), Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA), bajo la dirección del Dr. Carlos Llerena Suster y la Dra. María Eugenia Errasti.

Agradecimientos

Tengo la necesidad de agradecer a muchas personas, investigadores, amigos y familiares por su acompañamiento, su ayuda y los consejos durante la realización de todo este trabajo, además de aportar desde el compañerismo, el aguante y la amistad, que hicieron que esto en gran parte fuera posible. Es por esto que les quiero dedicar los siguientes párrafos a dichas personas, expresando mis agradecimientos.

El agradecimiento más especial es para mi familia. A mis padres por acompañarme siempre, por bancarme los estudios y porque gracias a ellos fue posible llegar hasta acá. A mis abuelos y a mi tía, que siempre fui bien recibido cuando necesité un cambio de aire.

También es necesario expresar mi agradecimiento al CiProVe y al CITEC, y a sus respectivos directores, por haberme permitido realizado mi trabajo final en dichas instituciones. Agradezco a mis directores por haber confiado en mí y haber compartido conmigo su experiencia en sus respectivos campos de estudio. Mis mas sinceros agradecimientos a la Dra. Eugenia Errasti, por el tiempo invertido en la colaboración de este trabajo, por su comprensión y buena predisposición.

A mis amigos de la vida les agradezco su acompañamiento, su apoyo y su comprensión por las ausencias de innumerables juntadas que impidieron compartir más tiempo.

A todos los amigos que me dió la Facultad, aquellas personas con los que pasé horas estudiando con mate en mano, renegando por las materias, motivándonos y alentándonos para rendir. A todos ellos les dedico un agradecimiento inmenso, porque gracias a ustedes, mi vida universitaria fue inolvidable.

ÍNDICE

1. Objetivos

1.1. Objetivos Generales.....	07
1.2. Objetivos Específicos.....	07

2. Introducción

2.1. Tratamiento tradicional del cuero.....	08
2.1.1. Remojo.....	09
2.1.2. Depilado.....	10
2.1.3. Desencalado.....	10
2.1.4. Curtido.....	11
2.1.5. Acabado.....	11
2.2. Tratamiento enzimático del cuero.....	11
2.3. Hidrolasas vegetales.....	12
2.3.1. Lipasas.....	12
2.3.1.1. Mecanismo catalítico de las lipasas.....	13
2.3.2. Proteasas.....	14
2.3.2.1. Mecanismo de las proteasas cisteínicas.....	15
2.4. <i>Araujia sericifera</i>.....	16
2.4.1. Características del látex de <i>Araujia sericifera</i>	17
2.4.1.1. Fracción insoluble.....	18
2.4.1.2. Fracción soluble.....	18

3. Materiales y Métodos

3.1. Obtención de los extractos

3.1.1. Obtención de la fracción insoluble del látex (FIL) y del látex completo (LAH) de <i>Araujia sericifera</i>	19
3.1.2. Obtención de los extractos proteolíticos.....	20

3.2. Actividad Lipolítica..... **20** |

3.2.1. Curva de calibración para la medida de concentración de ácidos grasos.....	20
3.2.2. Medida de la actividad lipolítica.....	21

3.3. Actividad Proteolítica..... **23** |

3.3.1. Medida de la actividad proteolítica.....	23
---	----

3.3.2. Caracterización de las proteasas solubles frente a sustratos representativos de la piel.....	24
3.3.2.1. Medida de la actividad albuminolítica.....	24
3.3.2.2. Medida de la actividad colagenolítica.....	25
3.3.2.3. Medida de la actividad queratinolítica.....	25
3.3.3. Medida de la concentración de proteínas.....	26
3.4. Ensayo de remojo.....	26
3.4.1. Efecto del NaCl y del bactericida sobre la estabilidad enzimática.....	27
3.4.2. Efecto del NaCl y del bactericida sobre la actividad enzimática.....	27
3.4.3. Evaluación de LAH como agente de remojo de pieles de carpincho.....	27
3.4.3.1. Determinación de concentración ácidos grasos en agua de remojo.....	28
3.4.3.2. Determinación de proteínas en agua de remojo.....	28
<u>4. Resultados y Discusión</u>	
4.1. Obtención de extractos.....	29
4.2. Actividad Lipolítica.....	30
4.2.1. Cuantificación de ácidos grasos.....	30
4.2.2. Efecto del tamizado.....	31
4.2.3. Efecto del agregado del sustrato en el medio de reacción.....	31
4.2.3.1. Diferencias entre la actividad lipolítica del FIL y del LAH.....	33
4.3. Actividad Caseinolítica.....	33
4.3.1. Determinación de la relación masa/volumen.....	33
4.3.1.1. Efecto del tamizado en la medida de la actividad caseinolítica.....	35
4.3.2. Evaluación del tiempo de extracción optimo.....	36
4.3.2.1. Determinación de actividades proteolíticas.....	36
4.3.2.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	37
4.4. Caracterización de las proteasas de <i>Araujia sericifera</i> frente a sustratos representativos de la piel.....	38
4.4.1. Determinación del rango lineal.....	39
4.4.2. Determinación de las actividades enzimáticas frente a los diferentes sustrato.....	41
4.5. Ensayo de remojo.....	42

4.5.1. Evaluación de la actividad y de la estabilidad enzimática en las condiciones de remojo.....	42
4.5.1.1. Efecto del NaCl y bactericida en la actividad proteolítica.....	42
4.5.1.2. Efecto del NaCl y bactericida en la actividad lipolítica.....	44
4.5.2. Evaluación de LAH como agente remojante de pieles de carpincho.....	45
4.5.2.1. Grado de humectación.....	45
4.5.2.2. Grado de apertura de las fibras.....	46
4.5.2.3. Concentración de ácidos grasos y de proteínas en el líquido de remojo.....	48
<u>5. Conclusiones</u>	51
<u>6. Perspectivas</u>	52
<u>7. Bibliografía</u>	53

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivos generales

1- Evaluar la utilización del látex de *Araujia sericifera* como una alternativa eco-compatible para la industria del cuero.

1.2. Objetivos específicos

- 1- Extraer el látex total y la fracción insoluble del látex de los frutos de *Araujia sericifera*.
- 2- Evaluar actividad enzimática (lipolítica y proteolítica) de los extractos enzimáticos.
- 3- Caracterizar la actividad proteolítica frente a sustratos representativos de la piel.
- 4- Comparar el proceso de remojo del método enzimático con el método tradicional.

2. INTRODUCCION

2.1. Tratamiento tradicional del cuero

El curtido es el proceso químico mediante el cual se convierten las pieles de animales en cuero. En las industrias del curtido se utilizan las pieles de los animales en bruto que se obtienen como subproducto de las industrias cárnicas, y que, de no ser por el curtido, habría que depositarlas en rellenos sanitarios o someterlas a incineración. Las pieles que más comúnmente se utilizan son las de bovino, porcino y ovino, las cuales constituyen la principal materia prima del sector industrial del curtido. El proceso de curtido consiste en la absorción y reacción de la dermis con los agentes curtientes, lo cual refuerza la estructura proteica de la piel (Gratacos *et al.*, 1962).

La piel consta de tres capas: epidermis, dermis y capa subcutánea. La dermis se utiliza para fabricar el cuero después de eliminar las demás capas con medios químicos y mecánicos. Contiene aproximadamente un 30 a un 35 % de proteína, que en su mayor parte es colágeno, siendo el resto agua y grasa. La grasa es un componente desafiante de las pieles para las curtiembres. El problema es que la grasa está incrustada a nivel del estrato corneo, donde los lípidos ocupan casi por completo el espacio intercelular entre los queratinocitos y desempeñan un importante papel como barrera hidrofóbica lo que hace que sea muy difícil de eliminar (Valsecchi *et al.*, 1978; Thorstensen, 1985).

El procesamiento del cuero (curtido) consta de las siguientes etapas:

- operaciones de precurtido: en donde se limpian las pieles o cueros. Incluye los procesos de remojo, depilado/apelambrado, desencalado y piquelado.
- operaciones de curtido (propriadamente dicho): aquí se estabiliza permanentemente la matriz de la piel y la propia piel; puede ser de dos tipos: el curtido con sales de cromo (III) y el curtido con agentes vegetales (taninos).
- operaciones de poscurtido y acabado: donde se agrega valor estético. Incluye el recurtido y el acabado (engrase, tinturación y terminación). El acabado incluye tareas mecánicas para dar forma y alisar la piel, y métodos químicos para colorear, lubricar, suavizar y aplicar un acabado superficial al cuero (Valsecchi *et al.*, 1978; Thorstensen, 1985; Stellman, 1998).

En la Figura 1, se describe brevemente las diferentes etapas que componen la transformación de la piel en cuero.

PROCESO	OBJETIVO	DURACIÓN	INSUMOS
Remojo	Recuperar la humedad de la piel	24 - 72 h	Surfactante, sales, bactericidas
Depilado	Eliminar epidermis y pelo de la piel	1 - 3 días	Oxido de calcio / sulfuro de sodio
Desencalado	Remover la cal y el sulfuro	12 h	Grandes volúmenes de agua y ácidos
Curtido	Estabilizar permanentemente las fibras de colágeno	8 – 48 h	Método químico (sulfato de cromo (III) en medio ácido)
Acabado	Agregado de valor estético (re-curtido, tintura y engrasado). Otorga flexibilidad y elasticidad (re-curtido) y resistencia (engrasado).	10 – 40 días	- Extractos vegetales con alto contenido de tanino. - Tintes o colorantes - Aceites y grasas naturales, y lípidos artificiales.

Figura 1. Esquema general del proceso de curtido.

2.1.1. Remojo

Los cueros generalmente son conservados mediante deshidratación, lo cual evita o reduce sustancialmente el ataque microbiano sobre la piel. El primer paso en el curtido, el remojo, tiene como objetivo que las pieles que llegan deshidratadas a la curtiembre recuperen la humedad para facilitar las operaciones posteriores. La eliminación de proteínas no colágenas, sangre y principalmente grasas, mejoran la absorción de agua, por lo que usualmente en el remojo convencional se hace uso de surfactante y sal además de bactericida para evitar la proliferación bacteriana (Angelinetti *et al.*, 1987).

Es a través del remojo que se puede, y se debe, alcanzar el estado flácido que la piel tenía originalmente. La presencia de agua dentro de la estructura fibrosa de la piel, es esencial debido a las siguientes razones:

- Favorece la disolución y eliminación de sales y proteínas globulares. Estas últimas tienen efecto cementante indeseable sobre las fibras curtidas secas si no se eliminan en los procesos previos al piquelado – curtido.
- Coadyuva la penetración de los productos químicos empleados en el proceso de depilado.

- Evita o disminuye los daños físicos sobre la estructura como consecuencia de las flexiones a que se somete la piel durante el movimiento (en fulones, aspas o en las operaciones de descarnado (Angelinetti *et al.*, 1987).

2.1.2. Depilado

El depilado es el paso siguiente en el proceso del curtido y su finalidad es eliminar la epidermis y pelos de la piel, mientras que la dermis deberá permanecer intacta en cuanto a su contenido y calidad de colágeno, proteína blanco del posterior paso de curtido.

El método convencional emplea CaO/NaS_2 , el cual resulta altamente contaminante medioambientalmente. El proceso se lleva a cabo provocando la rotura del enlace disulfuro (del aminoácido cistina de la queratina), empleando sulfuro de sodio. Según el modelo actual, el ion sulfuro es el agente depilante, por lo que el pH del medio es un factor importante. Se necesitan medios alcalinos para que el cociente SH/S^{-2} este desplazado hacia los iones sulfuros, evento que ocurre cuando el pH es igual o superior a 10. De esta manera, a menor pH, la capacidad depilante del sulfuro de sodio es menor ya que disminuye la concentración del ion sulfuro. Para mantener la alcalinidad del medio, en el depilado tradicional se suele utilizar cal (óxido de calcio), la cual no solo otorga el pH al medio, sino que también lo mantiene dado que actúa como buffer que permite regular el valor del pH dentro del rango entre 12 – 12,5 (Angelinetti *et al.*, 1987).

En el pelambre se emplea la acción alcalina de una solución acuosa de cal para promover la apertura o desdoblamiento de la estructura reticular del colágeno, como consecuencia de la eliminación de los puentes de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas vecinas (Angelinetti *et al.*, 1987).

2.1.3. Desencalado

Es en el proceso en el cual se lava la piel para remover la cal y el sulfuro, empleando importantes volúmenes de agua para evitar posibles interferencias en las etapas posteriores del curtido. Es necesario utilizar sustancias químicas como ácidos orgánicos tamponados (sulfúrico, clorhídrico, láctico, fórmico, bórico), sales de amonio, bisulfito de sodio, peróxido de hidrógeno, azúcares y melazas. Inclusive, se emplea el ácido sulfoftálico para lograr la neutralización del agua y la piel.

Esta etapa demanda de una gran cantidad de agua para el lavado de las pieles y para la preparación de las soluciones de los productos químicos (ácidos) para la

neutralización del agua de curtido y de la piel, generándose un importante volumen de aguas residuales y envases vacíos de las sustancias químicas utilizadas. (Valsecchi *et al.*, 1978; Stellman, 1998).

2.1.4. Curtido

En las operaciones de curtido propiamente dicho, se emplean ácidos, álcalis, sales y agentes curtientes para disolver las grasas y las proteínas no fibrosas y para enlazar químicamente las fibras de colágeno entre sí.

El sistema de curtido más antiguo se basa en la acción química de un material vegetal que contiene tanino (o ácido tánico). Se obtienen extractos de las partes de plantas que son ricas en taninos y se procesan convirtiéndose en líquidos curtientes. Los cueros se remojan en fosas o tinajas de líquidos curtientes cada vez más concentrados hasta que se curten, lo cual puede tardar semanas o meses. El curtido con agentes vegetales permite la conservación de la fibra del cuero y le proporciona ciertas características de morbidez al tacto y elasticidad que son consecuencia de los materiales curtientes y de los métodos de trabajo que se emplean. Actualmente, éste curtido se lo utiliza como paso de recurtido.

El curtido químico, el más utilizado, emplea sales minerales como el sulfato de cromo, por lo cual es el método más contaminante por el efecto tóxico del cromo (III). Antes de entrar al proceso de curtido se hace el escurrido de la piel para eliminar el mayor contenido de humedad. La acción del cromo (III) en un medio ácido (ácido clorhídrico), permite convertir a la piel en cuero (material estable), impidiendo su degradación. El tiempo de duración del proceso de curtido es de 8 a 24 h. (Valsecchi *et al.*, 1978; Stellman, 1998).

2.1.5. Acabado

Después del curtido continúan las operaciones de acabado las cuales se ejecutan de forma sucesiva en el mismo tambor. Estas operaciones de acabado son el recurtido, el coloreado y el engrase, cada una separada por operaciones intermedias de lavado y secado (Valsecchi *et al.*, 1978; Stellman, 1998).

2.2. Tratamiento enzimático del cuero

El uso de las enzimas por las curtiembres está tomando cada vez más relevancia porque se las incluye en tecnologías respetuosas al medio ambiente (Dettmer *et al.*, 2011). El empleo de enzimas implica una alternativa más amigable para el medio ambiente: esto

es, el diseño de procesos factibles y económicos que reduzcan la generación de la contaminación en sus propios orígenes, minimicen el consumo de energía y empleen materias primas renovables (Anastas *et al.*, 1998).

Entre las ventajas principales del uso de enzimas en curtiembres están:

-en el paso de remojo: el menor tiempo de humectación, la mejor apertura de la fibra, la solubilización y la eliminación de proteínas, grasas y carbohidratos.

-en el depilado: se pueden usar en procesos de limpieza, en la epidermis y en la eliminación del pelo, en la eliminación de los componentes residuales, en la eliminación/dispersión de los componentes adiposos, entre otros (Dettmer *et al.*, 2011).

Las enzimas que se utilizan durante el proceso de remojo y depilado son las enzimas amilolíticas, lipolíticas y proteolíticas. Las proteasas y lipasas mejoran la absorción de agua al descomponer las proteínas solubles dentro de la matriz, facilitando así la eliminación de sales, ácido hialurónico, grasas y aceites dispersos junto con la suciedad y otros contaminantes presentes en la piel. Reduce las arrugas en el cuero y afloja la piel. También mejora la apertura de la estructura de la fibra (Altan *et al.*, 2008).

2.3. Hidrolasas vegetales

En los vegetales, las hidrolasas están involucradas en procesos metabólicos vitales para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los mismos. Muchas de estas enzimas, entre ellas proteasas, pectinasas, xilanasas, esterases, poligalacturonidasas, celulasas, son de gran interés industrial por la variedad de procesos en que pueden ser aplicadas. (Obregón, 2008).

2.3.1. Lipasas

Si bien las lipasas más abundantes y estudiadas provienen de bacterias, hongos y levaduras, también están ampliamente distribuidas en el reino vegetal.

Muchas de las lipasas estudiadas en las plantas se han detectado en las membranas biológicas. Las mismas han sido analizadas desde el aspecto funcional dentro de los tejidos vegetales (estudios “in situ”) pero algunas, como es el caso de las lipasas de maíz, colza y ricino, se han solubilizado y purificado, ya sea parcialmente o hasta homogeneidad. Actualmente, las fuentes de lipasas vegetales y sus posibles aplicaciones no se encuentran lo suficientemente desarrolladas para competir con las lipasas de origen microbiano (Pandey *et al.*, 1999).

En las células vivas, se piensa que las lipasas catalizan exclusivamente la hidrólisis de ésteres; sin embargo, in vitro también son capaces de catalizar la reacción inversa, es decir, la síntesis de ésteres a baja actividad acuosa. Dichas reacciones de esterificación desempeñan un papel importante para una variedad de aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, en la síntesis de compuestos enantiopuros y carbohidratos acilados, haciendo de las lipasas el grupo más importante de biocatalizadores para las industrias químicas (Benjamin *et al.*, 2001).

2.3.1.1. Mecanismo catalítico de las lipasas:

En la Figura 2 se muestra con detalle como ocurre la hidrólisis enzimática de los triacilglicéridos.

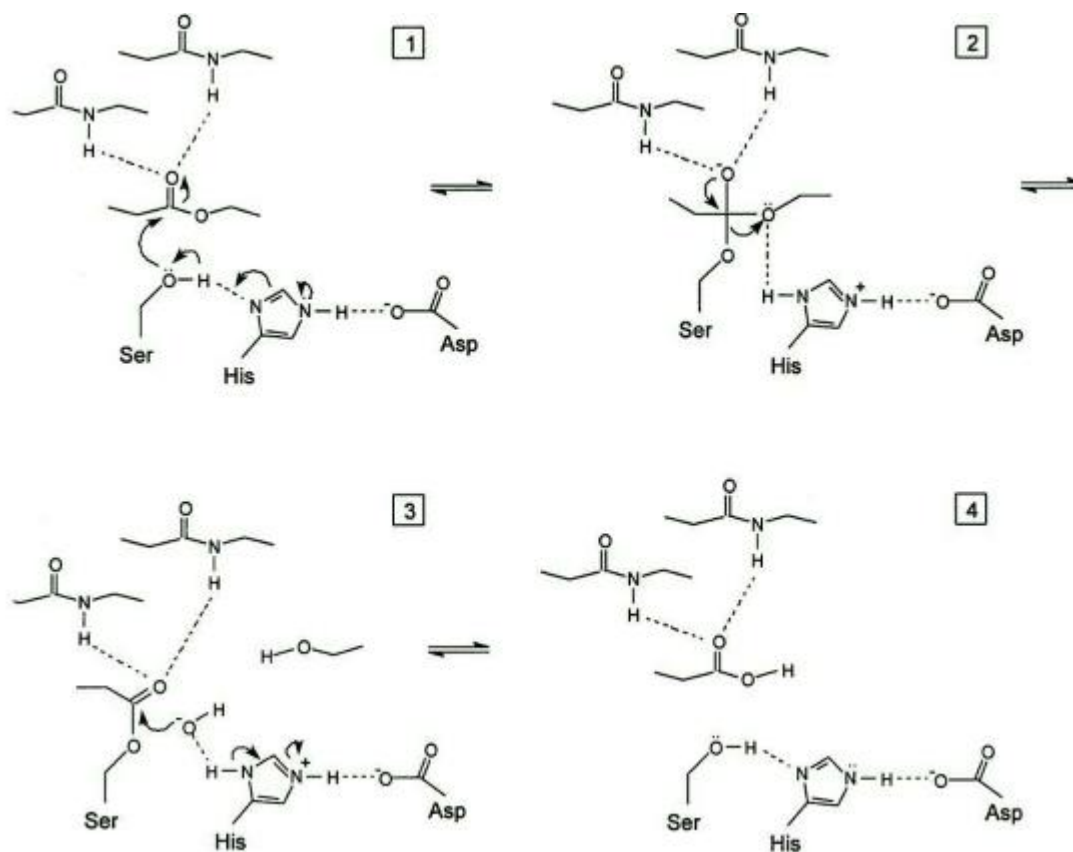


Figura 2: Mecanismo catalítico de las lipasas

[1] Unión del lípido, activación del residuo de Ser nucleofílico por la Hys vecina y ataque nucleofílico del carbonilo del sustrato por la Ser-O⁻.

[2] Intermediario tetraédrico transitorio, con la Ser-O⁻ estabilizada por interacciones con grupos peptídicos -NH-. La Hys dona un protón al componente alcohólico saliente del sustrato.

[3] El intermediario covalente (“acil enzima”) en el que el componente ácido del sustrato está esterificado con el residuo de Ser de la enzima. La molécula entrante de agua es activada por el residuo de Hys vecino, y el resultante ion hidroxilo realiza un ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono del carbonilo del intermediario covalente.

[4] El residuo de Hys dona un protón al átomo de oxígeno del residuo activo de Ser, el enlace éster entre la Ser y el componente acilo se rompe. Finalmente, el producto acilo es liberado (Di Santo Meztler, 2012).

2.3.2. Proteasas

Las proteasas son esenciales para muchos aspectos de la fisiología y el desarrollo de las plantas; sirven como catalizadores de procesos como la hidrólisis de proteínas de almacenamiento durante la germinación de semillas, la activación de proenzimas y la degradación de proteínas defectuosas, entre otros procesos.

La presencia de una alta concentración de enzimas proteolíticas en algunos tejidos vegetales es mucho más difícil de explicar: en los látices obtenidos de plantas de diversas familias, las enzimas proteolíticas representan más del 50% del total de proteínas. Aparentemente, hay varios recursos genéticos involucrados en un proceso evolutivamente convergente relacionado con la sobreproducción y acumulación de proteasas en diferentes familias de plantas (János *et al.*, 2013).

La mayoría de las proteasas son enzimas con promiscuidad en cuanto a su especificidad de sustrato. Este hecho llevó a proponer una clasificación de las mismas basadas en las características de sus respectivos mecanismos catalíticos, constituyendo en la actualidad siete subgrupos en la clasificación internacional: endopeptidasas serínicas, endopeptidasas cisteínicas, endopeptidasas aspárticas, metaloendopeptidasas, endopeptidasas treonínicas, endopeptidasas glutámicas y endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido.

In vitro, las proteasas (al igual que las lipasas) trabajan reversiblemente en ambas direcciones de la reacción. De esta manera, las proteasas presentan un amplio espectro de reacciones: hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos o amidas, esterificación, transesterificación y formación de enlaces amida. Una de las principales aplicaciones de

las proteasas es la resolución de compuestos racémicos mediante la hidrólisis enantioselectiva de sus ésteres (Benjamin *et al.*, 2001).

2.3.2.1. Mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas:

En la Figura 3 se describe con detalle el mecanismo de estas proteasas.

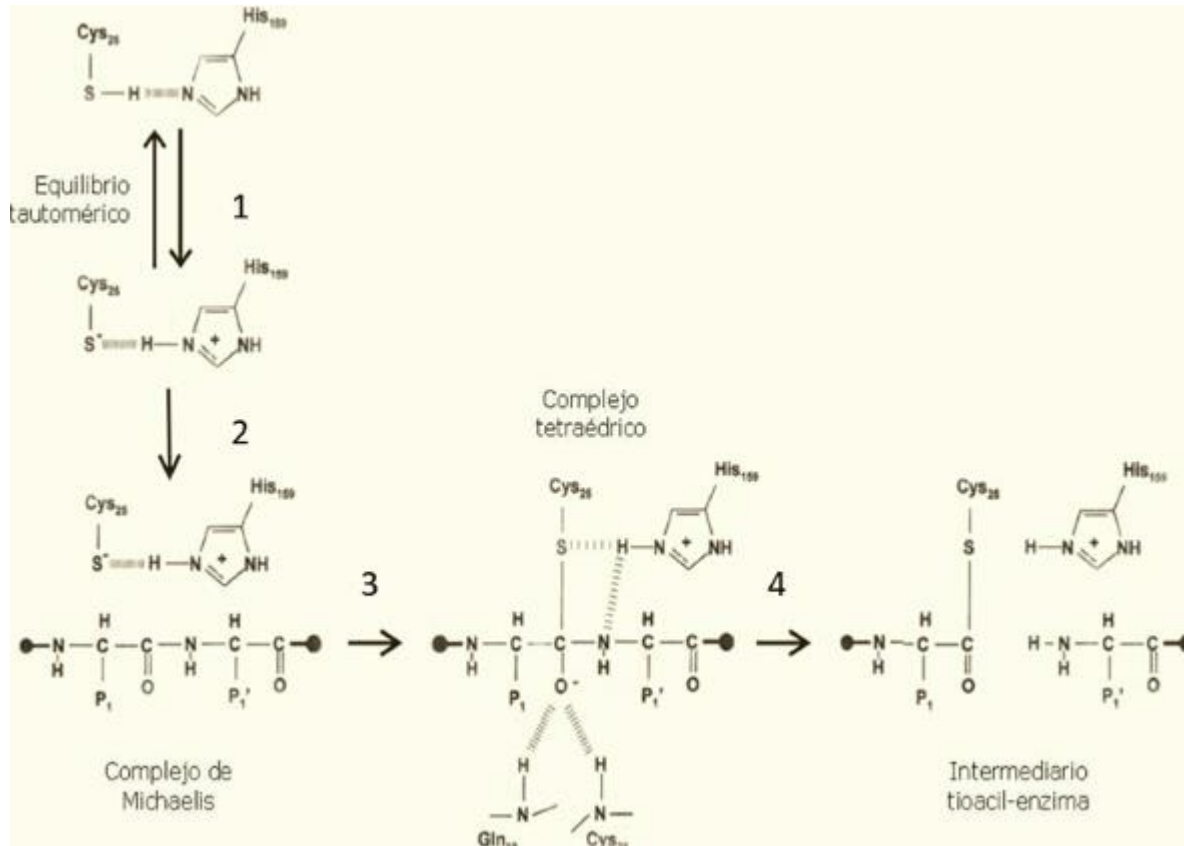


Figura 3: Mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas

[1] La cisteína catalítica está involucrada en un equilibrio tautomérico entre las formas neutras y dipolar (zwitterion).

[2] En la primera etapa (etapa de acilación) el sulfuro aniónico actúa como nucleófilo sobre el grupo carbonilo del sustrato.

[3] Se forma un intermediario covalente que se estabiliza a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la histidina. La formación de este intermediario procede a través de un estado intermedio de transición tetraédrico cargado negativamente.

[4] Durante la segunda etapa o etapa de deacilación, el intermediario acil-enzima es hidrolizado por una molécula de agua (nucleófilo) para liberar el péptido y restaurar el grupo

catalíticamente activo de la proteasa. La deacilación involucra también la formación de un estado de transición tetraédrico, que se produce a través de la reacción inversa a la vía de acilación.

Estas proteasas (cisteínicas) se caracterizan por ser inactivadas por reactivos bloqueantes de los grupos sulfhidrilos y tienen la capacidad de reactivarse en presencia de agentes reductores (Morcelle *et al.*,2004).

2.4. Araujia sericifera

Araujia sericifera pertenece a la familia Apocynaceae, la cual constituye un amplio grupo de plantas que incluye cerca de 366 géneros y más de 4500 especies. Son hierbas perennes, arbustos, lianas y, ocasionalmente, árboles, caracterizados por tener hojas opuestas, simples, presentar látex y muchas especies son venenosas si se ingieren. Las especies de esta familia se distribuyen primordialmente en las regiones tropicales.

El género *Araujia*, en Argentina, incluye cuatro especies nativas: *A. angustifolia*, *A. megapotamica*, *A. plumosa* y *A. sericifera*. (Obregón, 2008).

Araujia sericifera es una planta trepadora (o enredadera) que crece en el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina; es robusta y de larga vida con tallos entrelazados, finamente velludos, que contienen savia lechosa. Sus hojas emparejadas son de forma deltoide más o menos alargada (3 - 12 cm de largo y 1 - 6 cm de ancho), con superficies adaxiales de color verde oscuro. Las flores blancas, color crema o rosa pálido tienen forma de campana y cinco lóbulos de pétalos. Estas flores nacen en racimos de flores de pocas a varias en las hojas superiores. Su fruto es ovoide (6 - 12 cm de largo y 3 - 7 cm de ancho). Tienen una apariencia pálida de color verde azulado o verde grisáceo. Estos frutos sufren dehisencia, liberando numerosas semillas de color negruzco (4 - 8 mm de largo) que se cubren con un mechón de largos pelos sedosos blancos (20 - 30 mm de largo) (Dimitri, 1972).

En la Figura 4 se muestran fotografías de las hojas, frutos y flores de la especie *Araujia sericifera*.

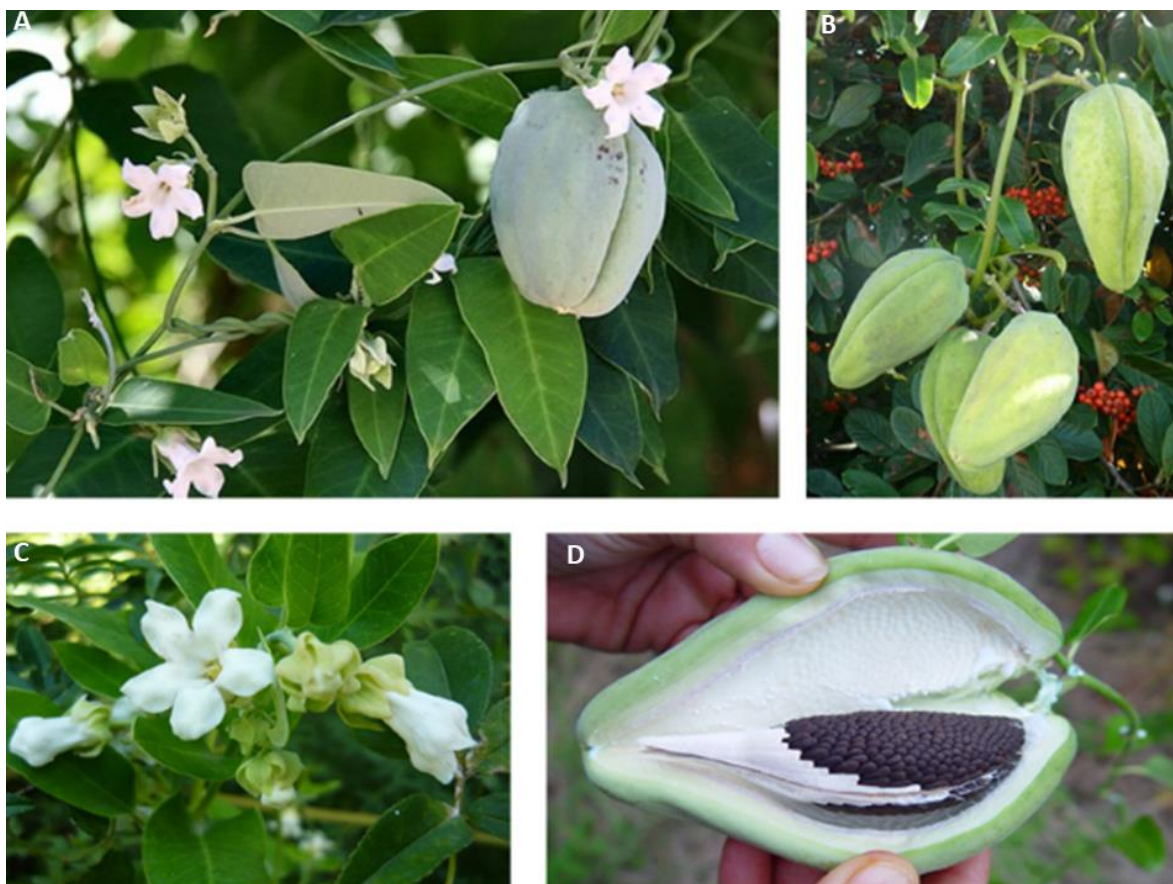


Figura 4: Morfoanatomía de *A. sericifera*, A. Hojas, flores y frutos, B. Frutos y hojas, C. Flores y hojas, D. Frutos con semillas.

2.4.1. Características del látex de *Araujia sericifera*

El látex es el fluido lechoso contenido en la o las células de los tubos laticíferos. Está compuesto por una suspensión/solución de una mezcla compleja de diferentes sustancias: enzimas, terpenos, alcaloides, vitaminas, glúcidos, lípidos y aminoácidos libres y se han detectado componentes subcelulares, tales como núcleo, mitocondrias, ribosomas y vacuolas. La presencia de látex ha sido reportada en al menos 12000 especies de plantas pertenecientes a 900 géneros diferentes. Las enzimas detectadas en látex, tales como proteasas y quitinasas, sugieren un rol en el mecanismo de defensa de las plantas contra patógenos, parásitos y herbívoros (Pandey *et al.*, 1999).

Es posible obtener el látex realizando incisiones del órgano vegetal que lo contenga, permitiendo su exudación, y luego recolectarlo en una solución buffer apropiada en baño

de hielo y conteniendo componentes protectores que mantengan la integridad de las enzimas.

El látex de *Araujia sericifera* se puede obtener a partir de los frutos verdes. En el mismo se observan dos fracciones: una fracción insoluble, la cual está asociada a una alta actividad lipolítica; y una fracción soluble donde se encuentran principalmente las proteasas.

2.4.1.1. Fracción insoluble

La actividad óptima de la lipasa se encuentra a pH 8,5 y 60 °C cuando se utiliza como sustrato aceite de semilla de algodón, el cual está compuesto por una mezcla de lípidos que contienen en mayor proporción los ácidos grasos linoleico, palmítico y oleico.

Por otra parte, esta fracción se utilizó con buenos resultados en la hidrólisis de ésteres p-nitrofenilados, especialmente en el butirato de p-nitrofenilo. Mientras que, en la síntesis de ésteres, se vio una preferencia por el ácido butírico y el ácido láurico. (Di Santo Meztler).

2.4.1.2. Fracción soluble

El látex de frutos de *Araujia sericifera* contiene tres proteasas *araujaína h I*, *araujaína h II* y *araujaína h III*. Las tres fracciones poseen máxima actividad caseinolítica en un rango de pH entre 8,0 y 9,0 y en presencia de cisteína.

La *araujaína h I* es activada por compuestos de tiol e inhibida por los reactivos comunes que bloquean el tiol, particularmente E-64 y HgCl₂, lo que sugiere que la enzima pertenece al grupo de tipo catalítico cisteína proteasas. Se observó homología parcial (36-48%) con otras proteasas cisteínicas de plantas del mismo tipo en un fragmento interno obtenido por el tratamiento con la proteasa V8 (el N terminal se encontraba bloqueado).

Las endopeptidasas *araujaína h II* y *araujaína h III* son inhibidas irreversiblemente por iodoacetato y E-64, lo que sugiere que también pertenecen a la familia de las proteasas cisteínicas. Las secuencias N-terminales de *araujaína h II* y *araujaína h III* mostraron un alto grado de homología con otras endopeptidasas cisteínicas de plantas.

La actividad caseinolítica a distintas temperaturas muestra que las proteasas son estables, en presencia de caseína, entre 50 – 70 °C (Obregón *et al.*, 2001; Priolo *et al.*, 2000).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención de los extractos

3.1.1. Obtención de la fracción insoluble del látex (FIL) y del látex completo (LAH) de *Araujia sericifera*

Con el objeto de obtener el látex completo de *Araujia sericifera* (LAH), se procedió de la siguiente manera: se realizaron incisiones superficiales en los frutos y luego al látex se lo recolectó en un recipiente en baño de hielo (Figura 5 A). La suspensión fue liofilizada (40 mm Hg, - 52 °C, 48 h) y se la almacenó en heladera.

El procedimiento para obtener la fracción insoluble del látex (FIL) de *Araujia sericifera* fue similar al procedimiento anterior, con la diferencia de que el látex fue recolectado en 10 mL de EDTA 5 mM y sulfito de sodio 5 mM (Figura 5 B). Posteriormente, la suspensión obtenida se centrifugó a $9600 \times g$, durante 30 min a 4 °C y se lo liofilizó en las mismas condiciones (Obregón, 2008; Priolo *et al.*, 2000).

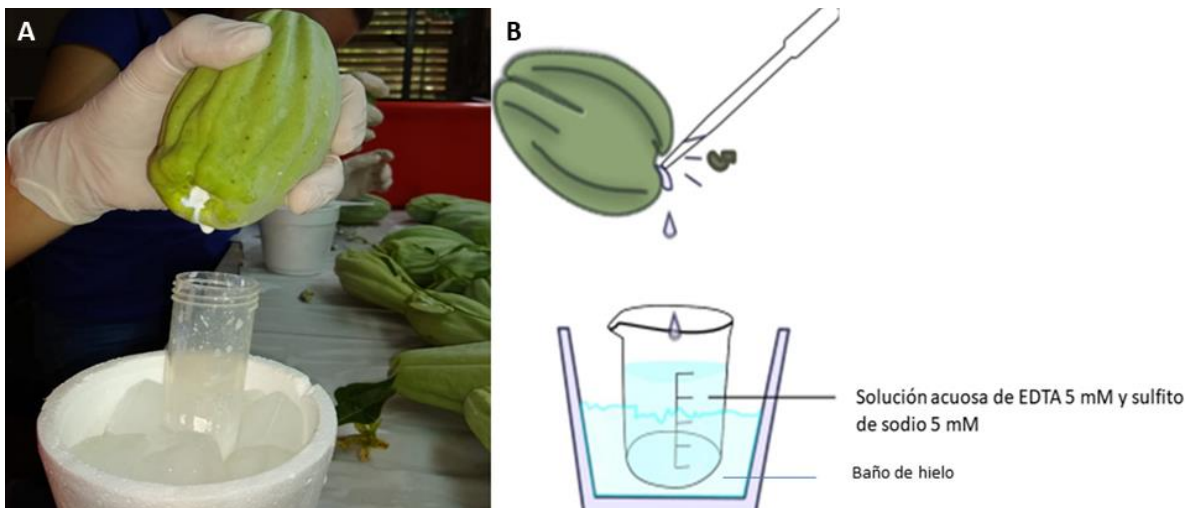


Figura 5: Foto (A) y esquema (B) de la recolección del látex (adaptación basada de una imagen extraída de Di Santo Meztler, Paula (2012))

Por otro lado, también se procedió al triturado y tamizado de los liofilizados. Para ello, se depositó parte del liofilizado obtenido en un mortero de porcelana y con ayuda de un pilón de porcelana se realizaron movimientos de rotación sobre el látex, de manera de ejercer una leve presión sobre las partículas hasta convertirlo en partículas de menor tamaño. El tamizado consistió en depositar parte del material tratado en mortero sobre un tamiz de Mesh 100 (diámetro de poro = 150 μm) que luego fue cernido de manera que sólo las partículas más finas, es decir, las que tengan un diámetro menor o igual al poro del

tamiz, puedan pasar. Las mismas se recolectaron en papel aluminio y se almacenaron en viales de vidrio en la heladera.

3.1.2. Obtención de los extractos proteolíticos

Debido a que los ensayos para medir la actividad proteolítica requirieron de la enzima soluble, se decidió solubilizarla desde LAH, así como del FIL. Para ello fue necesario optimizar la relación masa/volumen necesaria y el tiempo de extracción a fin de obtener una cantidad medible del producto de hidrólisis de la proteasa activa.

- Determinación de la relación masa/volumen de buffer óptima

Para evaluar la concentración en la cual se solubilizará la suficiente proteasa de forma de poder detectar la actividad proteolítica, se ensayaron extracciones con diferentes relaciones masa de liofilizado/volumen de buffer TRIS – HCl 0,1 M, pH 8,0.

Así, se procedió a pesar 5 mg del liofilizado (LAH/FIL) que fue resuspendido en 1, 3 y 5 mL del buffer de manera que las relaciones masa/volumen estén entre 1 y 5 mg/mL. Cada una de las suspensiones fueron agitadas de forma manual durante 2 min, y luego fueron centrifugadas a $4700 \times g$ durante 2 min a $4^\circ C$. Los sobrenadantes fueron recolectados y conservados a $-20^\circ C$ hasta el momento de su uso.

- Determinación del tiempo de extracción óptimo

Se evaluó el tiempo de extracción óptimo bajo dos condiciones de pH y temperatura: buffer TRIS – HCl 0,1 M pH 8,0 a $25^\circ C$ y buffer ácido cítrico 0,1 M – citrato de sodio 0,1 M pH 4,2 a $0^\circ C$, ambas bajo agitación magnética, empleando la relación masa/volumen óptima determinada del ensayo anterior. Se extrajeron a diferentes tiempos (0 min a 120 min) alícuotas de 3 mL e inmediatamente se centrifugaron a $9600 \times g$ durante 5 min a $4^\circ C$. Los sobrenadantes fueron recolectados y conservados a $-20^\circ C$ hasta el momento de su uso.

3.2. Actividad Lipolítica

3.2.1. Curva de calibración para la medida de concentración de ácidos grasos

Para determinar la concentración de ácidos grasos liberados se preparó una curva de calibración utilizando como estándares soluciones que abarcan de 0,25 a 1,50 mg/mL de ácido oleico en isooctano.

Se tomó 3 mL del estándar y se le agregó 0,6 mL de la solución de CuAc_2 5 % p/v - Py pH 6. Se lo agitó en vórtex durante 90 a 120 seg. A la mezcla se la centrifugó durante 10 min a 15 °C a 9600 × g. Al finalizar, se tomó la fase orgánica y se midió la absorbancia a 715 nm.

Se definió una unidad lipolítica (Ulip) como la cantidad de enzima que libera 1 mg de ácidos grasos en la fase orgánica por min:

$$Act = (C(mtra) - C(bco)) \left(\frac{\text{volumen de fase orgánica}(mL)}{\text{tiempo de reacción}(min)} \right)$$

Dónde:

C(mtra) = concentración de ácidos grasos en la muestra en mg/mL

C(bco) = concentración de ácidos grasos en el blanco en mg/mL

Volumen de fase orgánica = volumen de isooctano + volumen de algodón = 4,75 mL

Tiempo de reacción = 2 min

Las muestras y los blancos se realizaron por quintuplicado. Los datos se expresan como la media ± DE (desviación estándar).

3.2.2. Medida de la actividad lipolítica

En el presente trabajo se eligió un ensayo cuyo sustrato es el aceite de algodón. Dicho método se basa en la formación de un complejo de Cu (II) del reactivo con los ácidos grasos liberados del aceite de algodón por acción de las lipasas presentes en la fase orgánica.

Se pesó 5 mg de látex liofilizado (FIL o LAH) dentro de viales de vidrio, en una balanza analítica, y se le introdujo un buzo magnético. Luego, a un vial de vidrio, se agregó los componentes del medio de reacción en el siguiente orden: 1) Buffer de reacción, 2) CaCl_2 , 3) isooctano, 4) sustrato (aceite de algodón) (Tabla 1). Cuando se agrega el aceite de algodón al vial ocurre el inicio la reacción. La reacción dura aproximadamente 2 min. La reacción se detuvo con 0,5 mL de HCl 6N, dejando homogeneizar unos 30 seg. Luego, la mezcla se trasvasa a un tubo de centrifuga de 15 mL. La mezcla se centrifuga durante 10 min a 15 °C a 9600 × g. Se tomó 3 mL de la fase orgánica y se lo trasvasa a otro tubo de centrifuga de 15 mL. Se agregó 0,6 mL de una solución de CuAc_2 5 % p/v - piridina (Py) pH 6 y se lo agitó en vórtex durante 90 a 120 seg. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. En la Figura 6 se esquematiza el protocolo descripto.

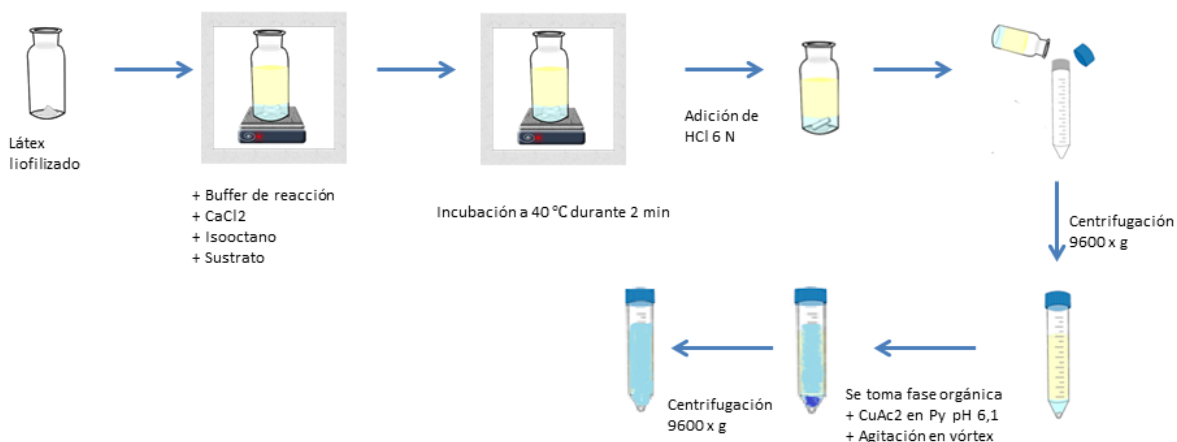


Figura 6: Protocolo del ensayo de actividad lipolítica (adaptación basada de una imagen extraída de Di Santo Meztler, Paula (2012))

Al finalizar, la fase orgánica fue separada y se midió la absorbancia a 715 nm (Di Santo Meztler *et al.*, 2012).

En la Tabla 1 se indican los componentes de la mezcla de reacción para 2 dos medios ensayados así como el orden en el cual fueron adicionados en el vial de vidrio.

Tabla 1: Medio de reacción empleado para la medida de la actividad lipolítica.

ORDEN	COMPONENTES	MEDIO 1	MEDIO 2
1	Muestra	5 mg	5 mg
2	Buffer TRIS – HCl 0,1 M pH 8,0; 1 % v/v tritón-X, EDTA 5 Mm	0,5 mL	0,5 mL
3	CaCl ₂ 0,15 M	0,2 mL	0,2 mL
4	Isooctano	4,5 mL	-
5	Aceite de algodón	0,25 mL	-
6	Aceite de algodón en isooctano 5,55 %v/v	-	4,75 mL

También se realizaron blancos de reacción, en los cuales se siguió el mismo protocolo, pero sin el agregado de la muestra.

3.3. Actividad Proteolítica

3.3.1. Medida de la actividad proteolítica

Para medir la actividad proteolítica de las muestras enzimáticas se eligió la caseína como sustrato y se realizó el ensayo de la actividad caseinolítica (López *et al.*, 2000).

Para ello, caseína al 1% p/v en buffer TRIS - HCl 0,1 M de pH 8,0 fue calentada a baño maría durante 20 min para lograr su disolución. Finalmente, la suspensión se filtró en caliente y se la dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente para la posterior adición de cisteína (12 mM). Dado que el sustrato, junto demás componentes de reacción, se van a termostatar, es importante destacar que la cisteína se debe agregar poco tiempo antes de iniciar el ensayo debido a que es termolábil.

La reacción se llevó a cabo a 35 °C. Para evitar la autodigestión de la enzima, a la misma se la mantuvo en baño de hielo hasta el momento de la reacción. Aun así, la alícuota de enzima fue lo primero que se agregó a los tubos de reacción (ya termostatizados a 35 °C), permitiendo que cuando se agrega el sustrato (también termostatizado), la enzima pueda alcanzar la temperatura de reacción rápidamente.

Cuando se agrega la caseína comienza la reacción, por lo que a partir de este momento se comenzó a cronometrar el tiempo de reacción. En todos los casos, el tiempo de reacción fue de 2 min y se detuvo con 1,8 mL de TCA 5% p/v.

Las cantidades empleadas, así como el orden de incorporación de los componentes de la mezcla de reacción se encuentra detallado en el Tabla 2.

Tabla 2: Medio de reacción empleado para la medida de la actividad caseinolítica

ORDEN	COMPONENTES	CANTIDAD
1	Muestra	100 µl
2	Caseína 1% en Buffer TRIS – HCl 0,1 M pH 8,0 12 mM Cys	1,1 mL
3	TCA 5% p/v	1,8 mL

También se realizó un blanco de reacción, el cual consistió en la misma mezcla de reacción, pero cambiando el orden, el cual fue: 1) muestra, 2) TCA 5% y 3) caseína.

Después de 15 min a 4 °C para facilitar la precipitación de la caseína no degradada, los tubos de reacción fueron centrifugados a 4800 × g durante 20 min a 25 °C.

Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm (Abs280) (López *et al.*, 2000). Las muestras se realizaron por triplicado y los blancos por duplicado.

Se definió una unidad caseinolítica (Ucas) como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de Abs280 por min.

$$Act = \frac{(Abs280(mtra) - Abs280(bco))}{tiempo\ de\ reacción}$$

Dónde:

Abs280(mtra) = absorbancia de la muestra

Abs280(bco) = absorbancia del blanco

Tiempo de reacción = 2 min

3.3.2. Caracterización de las proteasas frente a sustratos representativos de la piel

Una vez definida las condiciones de extracción y determinada la actividad proteolítica del extracto proteolítico obtenido, se evaluó la posible acción enzimática sobre la piel usando sustratos representativos de proteínas presentes en la piel. Se determinó la actividad a 35 °C sobre los sustratos azul de polvo de piel (HPA) y azul de queratina (AK), que son considerados representativos de colágeno y queratina, respectivamente, así como también sobre albúmina. En todos los casos se usó como buffer de reacción (BR) Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 conteniendo cisteína 12 mM.

3.3.2.1. Medida de la actividad albuminolítica

Se usó como sustrato albúmina 1% p/v en BR. Las cantidades que se utilizaron y el orden en el que se agregaron los componentes en el tubo de reacción están enumeradas en la Tabla 3. Cuando se agrega la albúmina comienza la reacción, momento en el cual se comienza a cronometrar. Luego de 2 min la reacción se detiene con TCA 5% p/v.

Tabla 3: Medio de reacción empleado para la medida de la actividad albuminolítica

ORDEN	COMPONENTES	CANTIDAD
1	Muestra	100 µL
2	Albúmina 1% p/v en BR	1,1 mL
3	TCA 5% p/v	1,8 mL

La mezcla se centrifugó a 4800 × g durante 20 min a 25 °C. El sobrenadante fue separado y se le midió la Abs280 (Cantera *et al.*, 2003).

Se definió una unidad albuminolítica (Ualb) como como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0,001 unidades de Abs280 por min.

$$Act = (Abs280(mtra) - Abs280(bco)) \left(\frac{1000}{tiempo\ de\ reacción} \right)$$

Donde:

Abs280(mtra) = absorbancia de la muestra

Abs280(bco) = absorbancia del blanco

Tiempo de reacción = 2 min

3.3.2.2. Medida de la actividad colagenolítica

Se pesó 5 mg de HPA en un tubo de vidrio al cual se le incorporó 1,9 mL de BR, luego fue colocado en baño termostático a 35 °C bajo agitación magnética. La muestra (100 µL) fue incorporada a la mezcla de reacción en el momento en que se comenzó a cronometrar el tiempo de reacción. Finalmente, la reacción se finalizó colocando el tubo de vidrio en un baño de hielo durante 1 min y centrifugando a 4800 × g durante 20 min a 4 °C. Al finalizar la centrifugación, se tomó el sobrenadante y se le midió la absorbancia a 595 nm (Abs595) (Errasti *et al.*, 2018).

Se definió una unidad colagenolítica (Ucol) como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0,001 unidades de Abs595 por min.

$$Act = (Abs(mtra) - Abs(bco)) \left(\frac{1000}{tiempo\ de\ reacción} \right)$$

Donde:

Abs(mtra) = absorbancia de la muestra

Abs(bco) = absorbancia del blanco

Tiempo de reacción = 5 min

3.3.2.3. Medida de la actividad queratinolítica

El sustrato AK fue cortado con tijera en fragmentos de aproximadamente de 5 mm y fue pesado (3 mg) en un tubo Eppendorf. Luego se incorporó 1 mL de BR en el tubo y fue colocado en baño termostático a 35 °C. La muestra (100 µL) fue incorporada a la mezcla de reacción en el momento en que se comenzó a cronometrar el tiempo de reacción. A diferentes tiempos el sobrenadante fue extraído para medirle la absorbancia a 595 nm (Abs595) (Errasti *et al.*, 2018).

Se definió una unidad queratinolítica (Uka) como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0,001 unidades de Abs595 por min.

$$Act = (Abs(mtra) - Abs(bco)) \left(\frac{1000}{tiempo\ de\ reaccion} \right)$$

Dónde:

Abs(mtra) = absorbancia de la muestra

Abs(bco) = absorbancia del blanco

3.3.3. Medida de la concentración de proteínas

El método de Bradford se basa en la formación de un complejo de coloración azul entre los residuos de aminoácidos de las proteínas y el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). El CBB existe bajo dos formas coloreadas, una forma protonada de color naranja-rojo pálido con absorbancia a 465 nm y la otra azul con absorbancia a 595 nm. Este colorante se une fuertemente a proteínas interactuando tanto con los grupos cargados positivamente de las mismas como con sus grupos hidrofóbicos. En este entorno de grupos cargados positivamente, la protonación del colorante es suprimida, apareciendo un color azul que absorbe a 595 nm, y que exhibe un alto coeficiente de extinción, lo que le da una alta sensibilidad a la medida (Blakesley *et al.*, 1977).

El protocolo de reacción consistió en incubar durante 20 min 50 µL de las muestras con 2,5 mL del reactivo de Bradford. Finalmente se midió la absorbancia a 595 nm.

Para determinar la concentración de proteínas a partir de las absorbancias medidas se preparó una curva de calibración. Para ello se empleó como estándares soluciones de seroalbúmina bovina que van desde 0,1 mg/mL a 1 mg/mL realizando diluciones seriadas de 2/3 a partir de una solución stock de 1 mg/mL. Sobre dichas soluciones se siguió el mismo protocolo antes descrito.

3.4. Ensayos de Remojo

Durante el proceso de remojo en las curtiembres, las pieles son incubadas durante 1 a 3 días en agua conteniendo surfactantes (para favorecer la solubilización de las grasas), bactericida (para evitar el desarrollo microbiano) y NaCl (para favorecer la solubilización de proteínas globulares). Además, la eliminación de proteínas globulares puede mejorarse incorporando enzimas proteolíticas al líquido de remojo. Dada la presencia de lipasas y

proteasas en LAH, se propone usarlo como agente de remojo, reemplazando el uso de surfactantes.

Previo al ensayo de remojo en sí, se decidió evaluar si el bactericida y el NaCl afectaban la estabilidad y la actividad de las enzimas presentes en LAH.

3.4.1. Efecto del NaCl y del bactericida sobre la estabilidad enzimática

Suspensiones de LAH fueron incubadas durante 1 h a 25 °C con diferentes concentraciones de NaCl y de bactericida en ensayos independientes. Luego, la actividad proteolítica (previa centrifugación a 4800 × g durante 20 min a 25 °C) y la actividad lipolítica fueron medidas de acuerdo a los protocolos ya descriptos (sección 3.2.2. para lipolítica y sección 3.3.1. para proteolítica).

En ambos casos, las actividades enzimáticas fueron comparadas con sus respectivos blancos, es decir, con suspensiones de LAH incubadas en agua.

3.4.2. Efecto del NaCl y del bactericida sobre la actividad enzimática

De la misma manera, diferentes concentraciones de NaCl, por un lado, y de bactericida, por el otro, fueron incorporadas en los medios de reacción establecidos en los protocolos para los ensayos de la actividad lipolítica (sección 3.2.2.) y de la actividad proteolítica (sección 3.3.1.). Tales actividades enzimáticas fueron medidas y aquellas obtenidas sin el agregado de dichos compuestos en los medios de reacción.

3.4.3. Evaluación de LAH como agente de remojo de pieles de carpincho

El ensayo de remojo se evaluó empleando piel de carpincho conservada mediante secado. Para ello se cortaron rectángulos de la piel seca de 3,5 x 3,0 cm, se pesaron y una zona transversal previamente marcada fue observada mediante lupa a diferentes aumentos. Las imágenes fueron capturadas y procesadas mediante cámara adosada a la lupa. Luego fueron sumergidos en el medio de remojo en una relación de piel/agua de 0,875 cm²/mL de agua. En la Tabla 4 se indican los medios de remojo ensayados.

Tabla 4: Medios de remojo ensayados

	H2O	NaCl	Detergente	Bactericida	Enzima
Control positivo	X	X	X	X	

Control	X			X	
Negativo					
Enzima	X	X		X	X

A diferentes tiempos se tomaron los trozos de piel, se observó y fotografió la misma región transversal mediante lupa y luego de dejarlos escurrir 1 min y secarlos mediante papel absorbente hasta eliminar líquido superficial, se pesaron en balanza analítica. Con los valores de los pesos se calculó el grado de humectación (% de humectación) mediante la siguiente fórmula:

$$\%Hi = \frac{(\text{peso húmedo a tiempo } i - \text{peso seco})}{\text{peso seco}}$$

Mediante el software de la cámara adosada a la lupa se midieron los espesores de las pieles y se calculó la apertura de la fibra con la siguiente fórmula:

$$\%Ai = \frac{(\text{espesor a tiempo } i - \text{espesor seco})}{\text{espesor seco}}$$

Paralelamente, alícuotas se extrajeron del medio de remojo y se almacenaron a -20 °C para la posterior determinación de concentración de proteínas y ácidos grasos.

3.4.3.1. Determinación de concentración de ácidos grasos en agua de remojo

La técnica empleada a continuación es una modificación propuesta por Di Santo Meztler, Paula (2012). Se tomó 1,5 mL de la alícuota y se lo agitó en vórtex con 2 mL de isooctano. Posteriormente, se realizó una primera centrifugación durante 10 min a 15 °C a 9600 × g. Luego se tomó 1,5 mL de la fase orgánica y se le agregó 0,3 mL de una solución de CuAc₂ 5 % p/v - Py pH 6. Se lo agitó en vórtex durante 90 a 120 seg. A la mezcla se la centrifugó a 9600 × g durante 10 min a 15 °C. Al finalizar, se tomó la fase orgánica y se le realizó la medida espectrofotométrica a 715 nm.

3.4.3.2. Determinación de concentración de proteínas en agua de remojo

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford descrito en la sección 3.3.3. Previo a la determinación, las alícuotas se centrifugaron a 2000 × g durante 5 minutos a 15 °C para evitar posibles interferencias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de extractos

Se obtuvieron 3,2450 g de látex liofilizado a partir del látex extraído de 20 frutos verdes (Figura 7) de *Araujia sericifera*. Por otro parte, la fracción insoluble obtenida por centrifugación y liofilización del látex proveniente de 23 frutos, rindió 2,7679 g de fracción insoluble del látex (FIL).



Figura 7: Frutos verdes obtenidos de la especie Araujia sericifera.

Luego de la centrifugación, durante la obtención del FIL, se observó que la suspensión que se obtuvo tenía un aspecto turbio, por lo que se concluyó que quedaban gomas y materiales vegetales insolubles presentes en el látex. No obstante, debido a que se ha demostrado en estudios anteriores que la separación de la fracción insoluble empleando centrifugaciones sucesivas no muestra una mejoría significativa con respecto a la centrifugación inicial, se procedió a hacer todos los ensayos correspondientes a la fracción insoluble obtenida de esta forma (Di Santo Meztler *et al.*, 2012).

Una parte de los liofilizados fueron triturados y tamizados, separándose las partículas en función de su tamaño en dos fracciones: con diámetros menores a 150 μm y con diámetros mayores a 150. Esto se realizó para obtener liofilizados con partículas más homogéneas y pequeñas, lo que podría servir para obtener una mayor reproducibilidad en los ensayos posteriores.

4.2. Actividad Lipolítica

Se procedió a medir las actividades lipolíticas tanto en los liofilizados del látex completo como de la fracción insoluble dado que a la hora de la aplicación biotecnológica se prefiere que el látex sea sometido al menor número de pasos posible antes de su utilización.

4.2.1. Cuantificación de ácidos grasos

Para cuantificar el grado de hidrólisis del aceite de algodón, se realizó una curva de calibración. Se armó la curva de calibración de manera tal que relacione la intensidad de la absorbancia a 715 nm del complejo de Cu (II) – ácido graso que se genera en el medio de reacción con la concentración de ácido graso liberado durante la hidrólisis. La curva construida con un patrón de ácido oleico se muestra en la Figura 8:

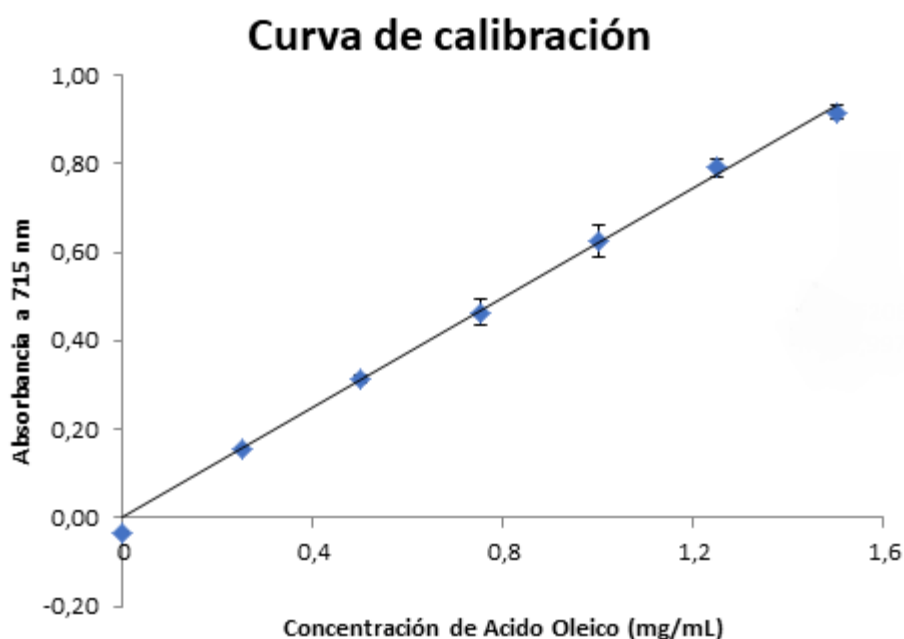


Figura 8: Curva de calibración utilizando como estándares soluciones que abarcan de 0.25 - 1.50 mg/mL de ácido oleico en isooctano.

La relación entre la absorbancia a 715 nm (Abs715 nm) y la concentración de ácido oleico está dada por la ecuación:

$$Abs(715 \text{ nm}) = 0,6208 C(\text{mg/mL})$$

Con un $r^2 = 0,9976$

4.2.2. Efecto del tamizado

La Figura 9 permite analizar el efecto de la etapa de tamizado sobre la actividad/mg de muestra.

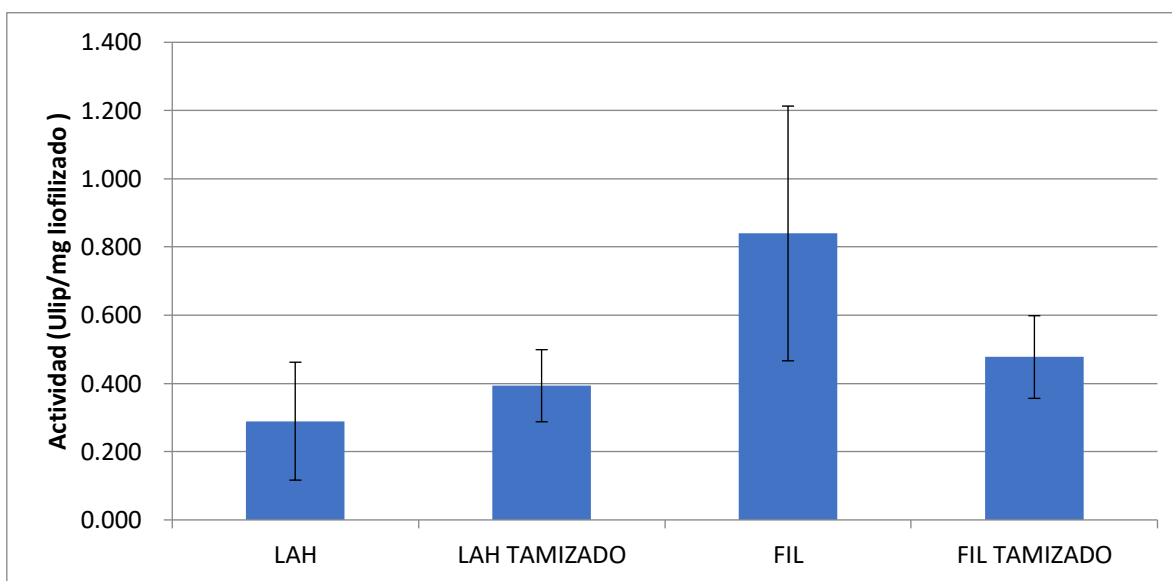


Figura 9. Comparación de la actividad/mg de liofilizado de las muestras tamizadas y sin tamizar de LAH y FIL. Se representa la media \pm DE.

En la Figura 9 se observa una menor dispersión de la actividad lipolítica de las muestras tamizadas con respecto a las muestras sin tamizar. Esta disminución de la dispersión puede deberse a que el tamizado permite homogeneizar el diámetro de partícula (menor o igual a 150 μm), dando superficies de contacto similares en los diferentes replicados.

4.2.3. Efecto del agregado del sustrato en el medio de reacción

Se modificó la forma en la que se agregó el sustrato en el medio de reacción. En un caso se agregó individualmente (Medio 1) mientras que en otro se realiza un mezclado previo del sustrato con el solvente isooctano (Medio 2). En ambos medios, se emplearon las muestras tamizadas.

Los resultados se muestran en la Figura 10:

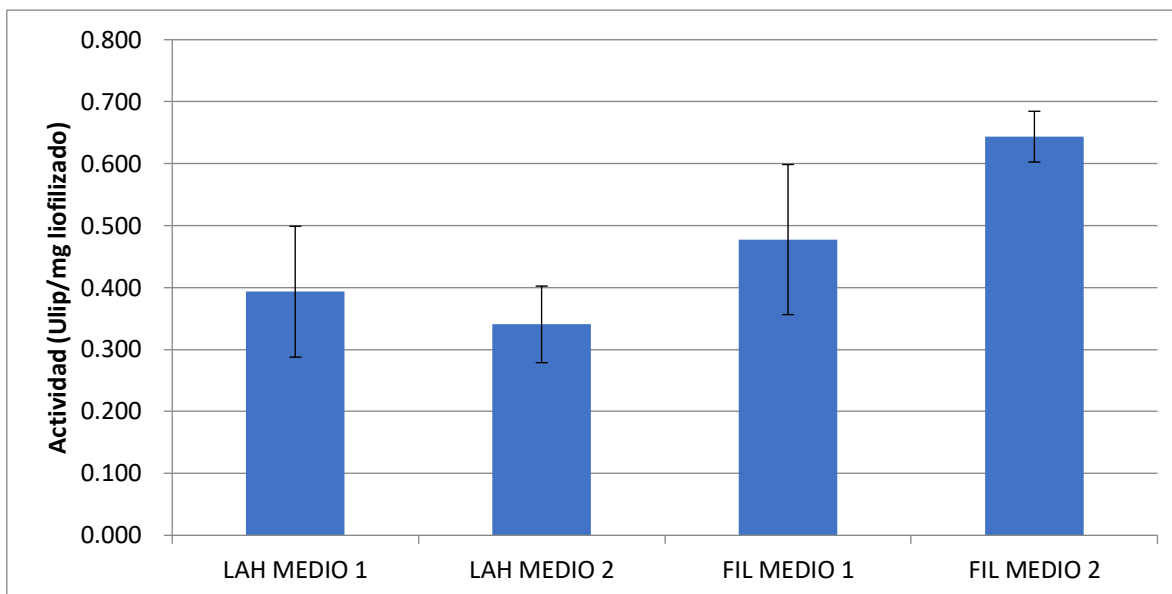


Figura 10: Comparación de la actividad/mg de liofilizado entre las muestras tamizadas de LAH y FIL empleando el medio 1 vs medio 2. Se representa la media \pm DE.

En la Figura 10 se observa una disminución de la dispersión para el Medio 2 para ambas muestras, dado que la disolución del aceite de algodón en el isooctano permite disminuir la viscosidad y, con ello, facilitar la carga y la descarga del volumen de aceite sobre los viales de vidrio donde se realiza la reacción.

Para el caso del FIL, se observa una mayor absorbancia cuando el sustrato se agrega mezclado con el isooctano, se puede suponer que existe una mayor disponibilidad de sustrato dado que estuvo homogeneizado con el isooctano desde el principio de la reacción.

Por lo tanto, se puede concluir que la dispersión se debía a un error metodológico por la alta viscosidad del aceite de semilla de algodón. Al disolverlo con el isooctano en la misma proporción que detalla la Tabla 1, permitió no solo homogeneizar el sustrato antes de la reacción, sino que también disminuyó la viscosidad permitiendo evitar los errores metodológicos.

4.2.3.1. Diferencias entre la actividad lipolítica del FIL y del LAH

En la Figura 9 se observa que el FIL sin tamizar presenta 2,5 veces más actividad lipolítica que el LAH sin tamizar. Las muestras tamizadas no presentan diferencias significativas como para asegurar que alguna de las muestras tenga mayor actividad.

El mismo comportamiento se observa en la Figura 10, siendo el caso más relevante el del Medio 2, donde FIL presenta 1,4 veces mayor actividad que el LAH en el mismo medio.

La mayor actividad del FIL con respecto al LAH puede deberse a que la fracción insoluble estaría enriquecida en lipasas. Además, se puede considerar que las proteasas, presentes en mayor proporción en LAH, podrían degradar a las lipasas interfiriendo de esta manera en la medida de actividad lipolítica.

4.3. Actividad caseinolítica

Debido a que el presente estudio tiene como objetivo evaluar un preparado para una posible aplicación industrial, es importante conocer la actividad enzimática por gramo del preparado a fin de conocer la masa de producto activo requerida por masa de piel.

Para ello, primero se midió la actividad caseinolítica de los preparados (LAH o FIL), pero se observó que la absorbancia medida estaba por fuera de rango de medición del espectrofotómetro, además de que no se observaba el precipitado de caseína característico de estos ensayos luego del agregado del TCA.

Debido a ello, se decidió solubilizar las proteasas del FIL y del LAH, suponiendo que componentes insolubles presentes en las partículas del látex estarían interfiriendo en el ensayo. Para ello, se evaluaron dos condiciones de solubilización: relación masa/volumen del liofilizado y tiempo de extracción.

4.3.1. Determinación de la relación masa/volumen

Dado que no se conocía la actividad caseinolítica de los preparados, se decidió determinar la proporción de masa de LAH o FIL por volumen de buffer, con actividad enzimática que fuera medible por este método.

En la Figura 11 se muestran las Abs₂₈₀ para los blancos y las muestras correspondientes a distintas proporciones de masa/volumen de los liofilizados. Se puede observar que para 5 mg/mL de LAH (Figura 11 A) y FIL (Figura 11 B) se observan

diferencias significativas entre las absorbancias de blancos y de muestras. Por otro lado, también se observa que dichas diferencias no son proporcionales a la cantidad de liofilizado como es lo esperable.

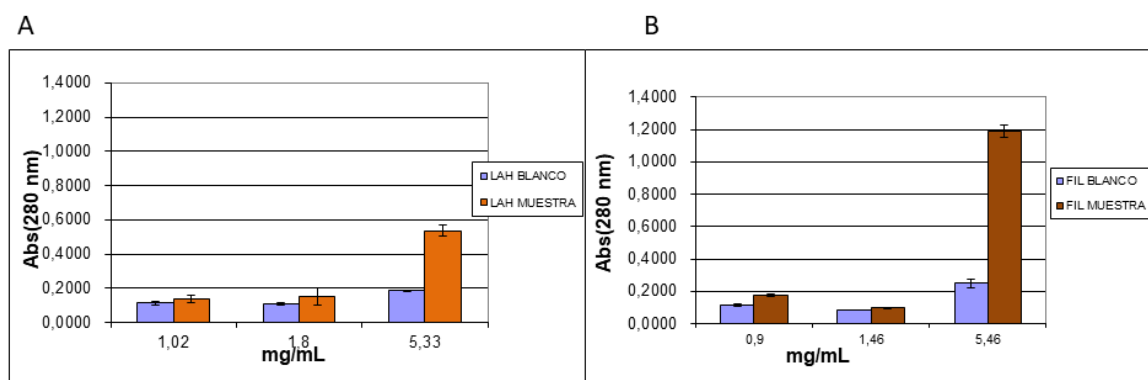


Figura 11: Absorbancia vs relación masa/volumen para A) LAH y B) FIL luego de realizar los ensayos de actividad caseinolítica. Se representa la media \pm DE.

En la Tabla 5 se exponen para cada preparado la actividad proteolítica por mg de liofilizado media de las tres relaciones masa/volumen ensayadas, así como la desviación estándar obtenida de dichos valores. Se observa una gran dispersión, lo cual no permite determinar con exactitud la actividad caseinolítica/mg de muestra.

Tabla 5: Actividad caseinolítica (Ucas) por mg de muestra (media) \pm DE.

	Ucas/mg de muestra	DE
LAH	0,2	0,1
FIL	0,4	0,4

Una explicación posible a la alta desviación estándar medida podría ser la alta heterogeneidad del diámetro de partícula del látex, lo que conlleva que, aun teniendo la misma cantidad de muestra (mg), en aquellos ensayos en donde haya partículas más grandes, habrá una menor superficie de contacto, y con ello, una menor exposición de las proteasas al sustrato. Esto es similar a lo que sucedió con la actividad lipolítica. En función

de esta suposición, el siguiente paso fue repetir los ensayos con las fracciones tamizadas de LAH y FIL.

4.3.1.1. Efecto del tamizado en la medida de la actividad caseinolítica

En la Figura 12 se muestran las Abs280 para los blancos y las muestras correspondientes a distintas proporciones de masa/volumen de los liofilizados tamizados.

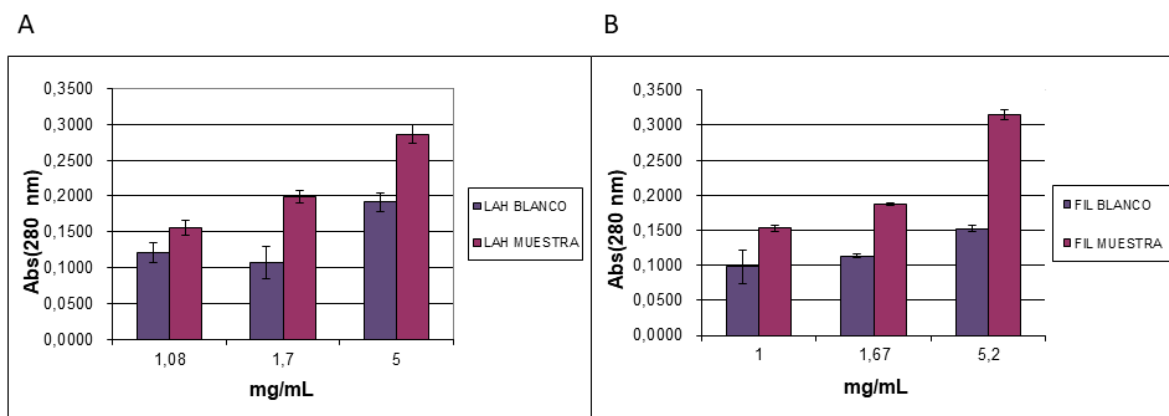


Figura 12: Abs280 vs relación masa/volumen para A) LAH tamizado y B) FIL tamizado luego de realizar los ensayos de actividad caseinolítica. Se representa la media \pm DE.

Se puede ver que ya a partir de 1,7 mg/mL de ambos preparados, las diferencias entre las absorbancias de la muestra y del blanco son mayores que para los preparados sin tamizar (Figura 10 A y 10 B). Por otro lado, cuando se calculan las Ucas/mg de muestra para cada proporción, se obtiene un valor constante el cual es reflejado en los bajos valores obtenidos para la DE (Tabla 6).

Tabla 6: Actividad caseinolítica (Ucas) por mg del liofilizado tamizado (media) \pm DE.

	Ucas/mg de muestra	DE
LAH	0,18	0,09
FIL	0,22	0,06

Otro aspecto importante para destacar es que LAH y FIL muestran similares Ucas/mg. Esto estaría indicando que, contrario a lo que se suponía, el FIL contiene

proteasas. Esto podría deberse a que las partículas insolubles del FIL contengan proteasas atrapadas y/o que las proteasas provengan de restos del sobrenadante que hayan quedado adheridas en la superficie de las partículas insolubles.

Tomando los valores de la Tabla 6, se eligió al LAH con una relación masa/volumen óptima de 1,7 mg/mL para los posteriores ensayos, ya que para relaciones mayores de masa/volumen se obtendrían valores de absorbancia por fuera del rango del espectrofotómetro cuando se realicen ensayos a tiempos de reacción mayores a 2 min.

4.3.2. Evaluación del tiempo de extracción óptimo

Para determinar el tiempo en el cual ocurre la mayor liberación de proteasa utilizando la relación masa de liofilizado/volumen de buffer de 1,7 mg/mL, se evaluó la actividad proteolítica y la concentración de proteínas a diferentes tiempos de extracción.

4.3.2.1 Determinación de actividades proteolíticas

En la Figura 13, se muestra la actividad en función del tiempo de extracción en dos condiciones: buffer TRIS - HCl (pH 8 – 25 °C) y buffer 0,1 M cítrico – 0,1 M citrato (pH 4,2 – 0 °C).

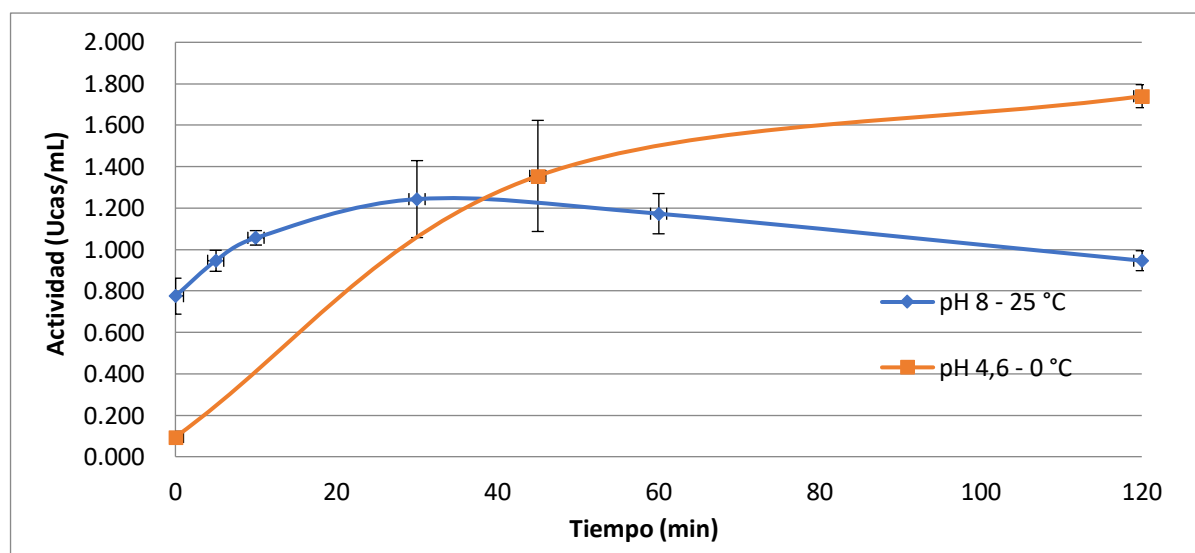


Figura 13: Actividad caseinolítica en función del tiempo de extracción en dos condiciones de pH y temperatura. Se representa la media \pm DE.

En las curvas de la Figura 12 se observa que a pH 8,0 y 25 °C se consigue la máxima actividad proteolítica a los 30 min, aunque luego decae. Mientras que a pH 4,2 y 0 °C, se

obtienen valores de actividad que aumentan más lentamente, pero a partir de los 45 min alcanza mayores valores que no decrecen. Esto podría deberse a que a pH 4,6 y 0 °C las proteasas de *Araujia sericifera* se encuentran alejadas de su pH y temperatura óptimos, minimizando la autodigestión. Por otro lado, el menor valor de actividad inicial puede ser consecuencia de la baja temperatura de trabajo que haría más lenta la liberación de la proteasa al medio de extracción.

Por lo tanto, se puede concluir que la mejor condición de extracción es la de pH 4,2 y 0 °C durante 45 min o más.

4.3.2.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para establecer las concentraciones de proteínas en las diferentes muestras se construyó una curva de calibración realizada con seroalbúmina bovina como patrón (Figura 14)

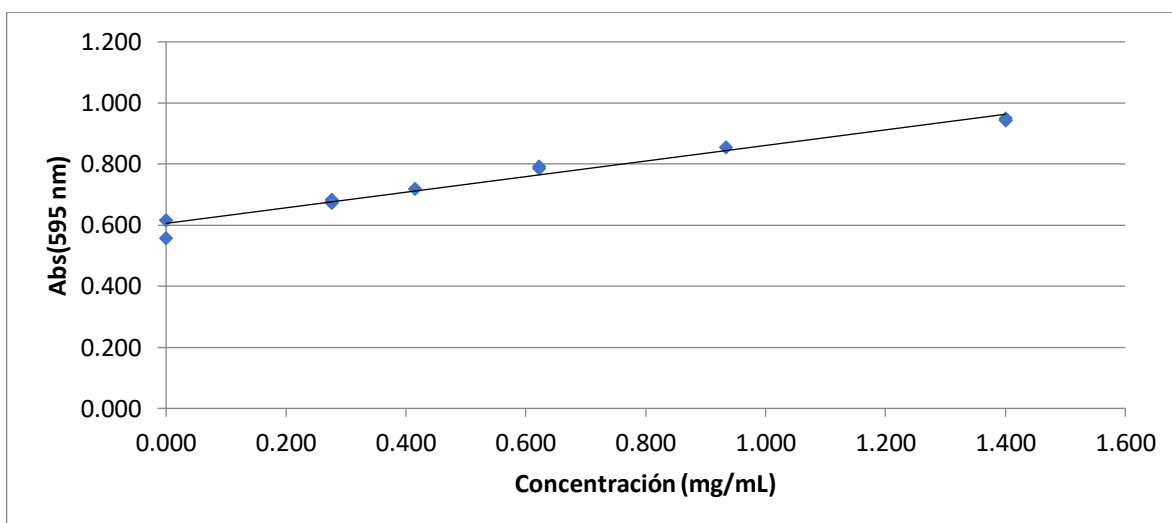


Figura 14. Curva de calibración de Bradford.

La ecuación obtenida fue:

$$Abs(595 \text{ nm}) = 0,2407 C(\text{mg/mL}) + 0,6197$$

Donde C es la concentración en mg/mL, con un $r^2 = 0,9886$

Usando dicha curva de calibración se determinaron las concentraciones de proteínas en las alícuotas tomadas a diferentes tiempos bajo las dos condiciones ensayadas (Figura 15).

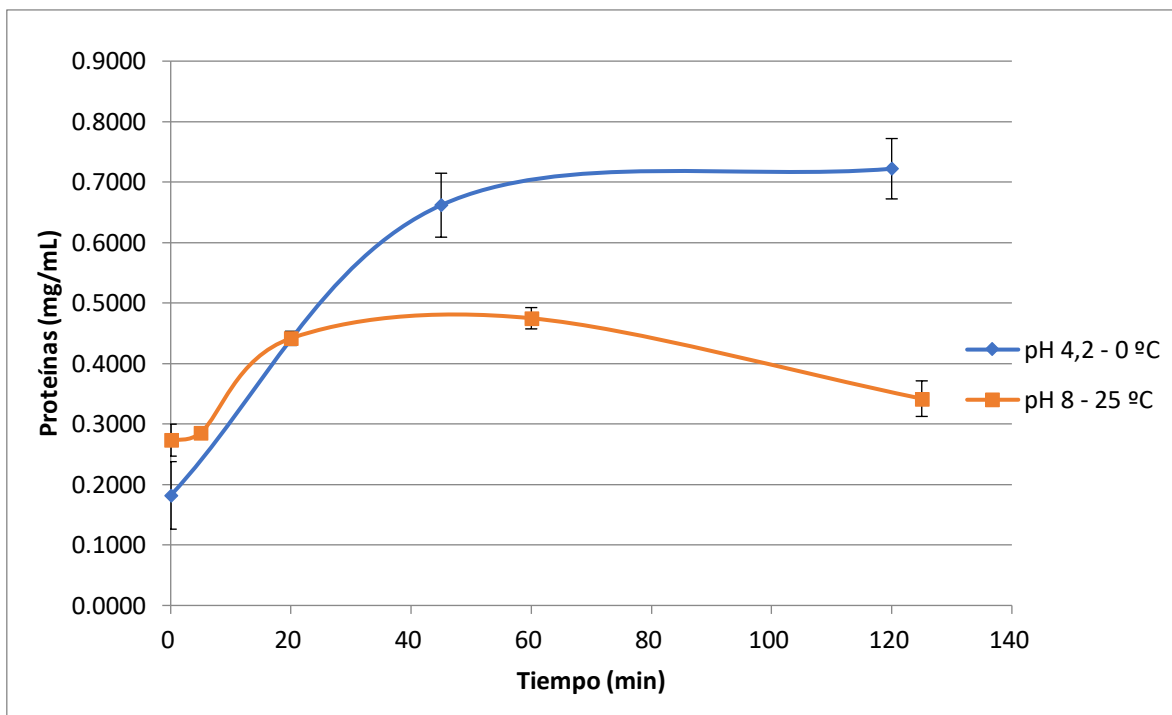


Figura 15. Concentración de proteínas en función del tiempo de extracción. Se representa la media \pm DE.

En las curvas de la Figura 15 se observa que en las condiciones de pH 8,0 y 25 °C la máxima concentración de proteínas extraídas se alcanza a los 30 min es de 0,47 mg/mL, mientras que para las condiciones de pH 4,2 y a 0 °C, la máxima concentración se alcanza después de los 45 min con un valor de es de 0,71 mg/mL. El comportamiento aquí observado es similar al obtenido midiendo actividad proteolítica (Figura 12), que por otro lado nos permite confirmar que en las condiciones de pH 8,0 y 25 °C existió autodigestión.

4.4. Caracterización de las proteasas de *Araujia sericifera* frente a sustratos representativos de la piel

Todas las muestras usadas para la determinación de las actividades sobre sustratos representativos de proteínas de la piel fueron obtenidas de acuerdo a las condiciones establecidas en la sección 4.3. Una vez realizada la extracción en pH 4,2 a 0 °C, empleando una relación masa volumen de 1,7 durante 45 min, los extractos se centrifugaron, se alicuotaron y se almacenaron a -20 °C.

4.4.1 Determinación del rango lineal

En la mayoría de las reacciones enzimáticas, cuando se traza la curva cinética enzimática, es posible obtener una zona inicial donde el consumo de sustrato o la aparición de producto es función lineal del tiempo. En esta zona, la pendiente se denomina “velocidad inicial” y es una medida de la actividad enzimática.

Para determinar la actividad albuminolítica, colagenolítica y queratinolítica fue necesario primeramente establecer el rango de los tiempos de reacción en el cual se pueda medir la velocidad inicial. Tomando valores previos con otras enzimas, se eligieron los siguientes rangos de tiempo de incubación:

- 0 a 30 min para la actividad albuminolítica
- 0 a 15 min para la actividad colagenolítica
- 0 a 120 min para la actividad queratinolítica

En la Figura 16 se muestra la Abs280 en función del tiempo del ensayo de actividad albuminolítica.

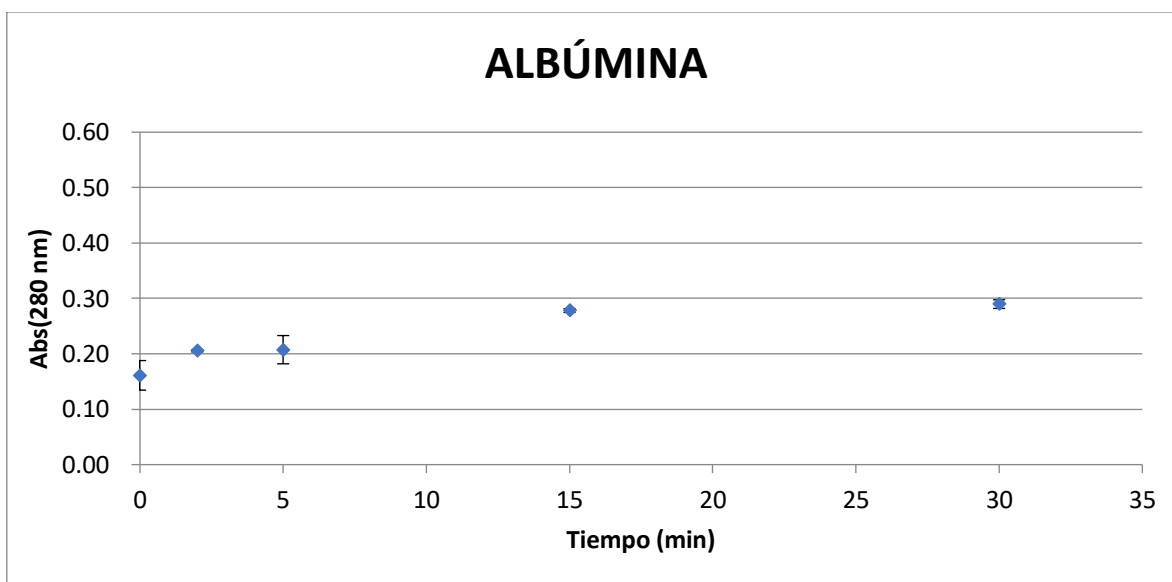


Figura 16. Abs280 vs tiempo de reacción para el ensayo de actividad albuminolítica

Del análisis de los valores de la Figura 15 se eligió como tiempo de reacción para la medida de la actividad albuminolítica 2 min, ya que a tiempos mayores no sigue un rango lineal.

En la Figura 17 se muestra la Abs595 en función del tiempo del ensayo de actividad colagenolítica.

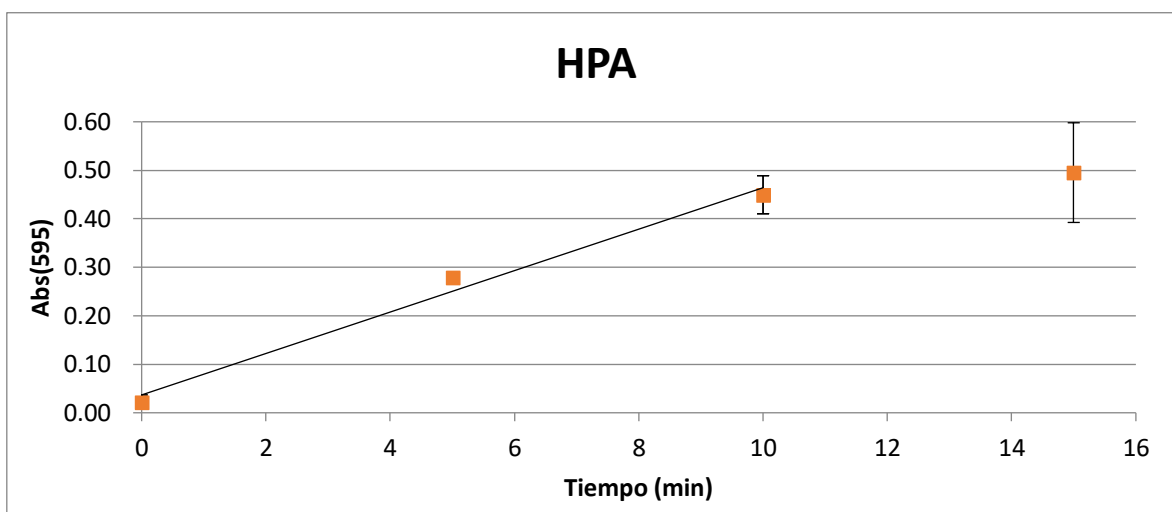


Figura 17. Abs280 vs tiempo de reacción para el ensayo de actividad colagenolítica.

La curva de la Figura 17 muestra un comportamiento lineal hasta los 10 min de reacción. Para corroborarlo, se calculó la recta por cuadrados mínimos cuya ecuación es la que sigue:

$$Abs(595 \text{ nm}) = 0,0427 \text{ tiempo (min)} + 0,0368$$

Siendo el $r^2 = 0,9864$, lo cual confirma que se está en el rango lineal. Por lo tanto, para el ensayo de la actividad colagenolítica se eligió como tiempo de reacción 5 min.

En la Figura 18 se muestra la Abs595 en función del tiempo del ensayo de actividad queratinolítica:

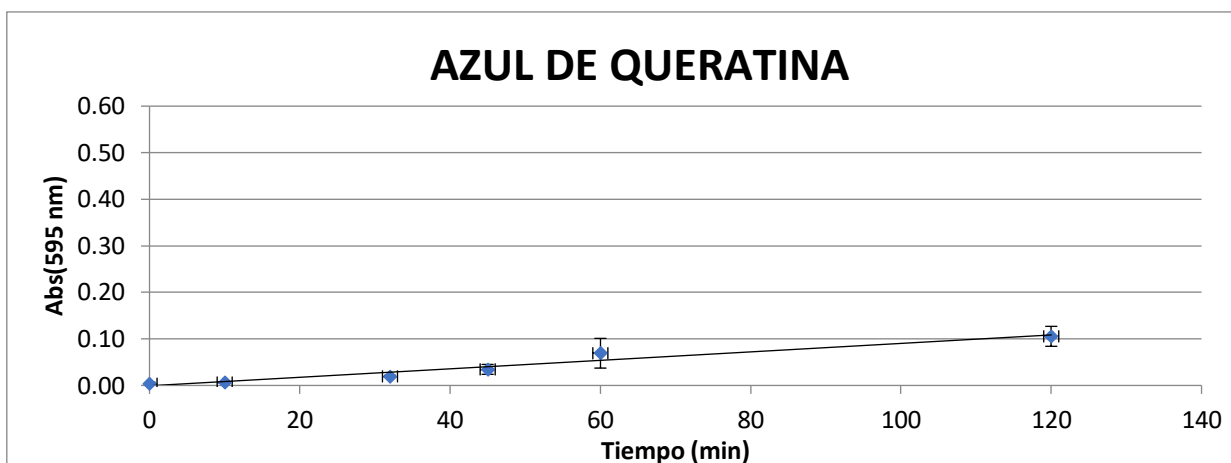


Figura 18. Abs280 vs tiempo de reacción para el ensayo de actividad queratinolítica.

A partir de la Figura 18 se puede ver un comportamiento lineal que se prolonga hasta los 120 min. Para verificar este comportamiento se determinó la recta por cuadrados mínimos, cuya ecuación es la que sigue:

$$Abs(595 \text{ nm}) = 0,0009 \text{ tiempo (min)} - 0,0007$$

Con un valor de $r^2 = 0,9529$, confirmando la linealidad en el rango ensayado.

4.4.2. Determinación de las actividades enzimáticas frente a los diferentes sustratos

Una vez establecidos los tiempos de reacción se determinaron los valores de actividad enzimática para cada uno de los sustratos representativos de la piel anteriormente mencionados. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Actividades enzimáticas para los diferentes sustratos empleados a 35 °C y pH 8. Se muestran las medias \pm DE.

ACTIVIDADES FRENTE A SUSTRATOS PROTEICOS REPRESENTATIVOS DE LA PIEL		
Unidades	Actividad/mL	Tiempo de reacción (min)
CASEINOLITICA (Ucas)	0,23 \pm 0,08	2
ALBUMINOLITICA (Ualb)	240 \pm 90	2
COLAGENOLITICA (Ucol)	500 \pm 30	5
QUERATINOLITICA (Uka)	0,9 \pm 0,2	120

En el tratamiento enzimático de la piel, durante el proceso de remojo, se busca que las proteasas utilizadas no afecten la estructura del colágeno, pero sí sean capaces de degradar las proteínas globulares, lo cual se mide mediante su actividad albuminolítica. La eliminación de estas proteínas permite una mayor apertura de las fibras de colágeno, lo cual favorece la entrada de los productos químicos empleados en los próximos pasos del curtido. A su vez, es deseable que las proteasas tengan una actividad queratinolítica moderada, lo suficiente como para que comience a degradar la queratina de la capa epidermis, así como de los folículos pilosos. Esto facilitaría el proceso de depilado que sigue al del remojo. Sin embargo, la actividad queratinolítica no debe ser tan alta como para degradar completamente los pelos, ya que se liberaría gran cantidad de materia orgánica en los efluentes.

Los valores de actividad albuminolítica, colagenolítica y queratinolítica aquí expuestos para las proteasas contenidas en LAH, permiten tener una primera caracterización del preparado frente a algunos componentes de la piel que son claves durante su transformación en cuero. Dichos valores podrán ser contrapuestos con los de proteasas comerciales de remojo permitiendo un mayor conocimiento de su mecanismo de acción, así como de su optimización.

4.5. Ensayo de Remojo

4.5.1 Evaluación de la actividad y estabilidad enzimática en las condiciones de remojo

Los agentes utilizados habitualmente en los ensayos de remojo son NaCl 0,25 M, bactericida 0,12% p/v y surfactante 0,25% p/v. Para evaluar si el NaCl y el bactericida afectan las enzimas, se realizaron ensayos para medir actividad proteolítica y lipolítica antes y después de incorporar dichos compuestos en el medio de reacción (efecto sobre actividad) así como en el medio de incubación de LAH durante 1 h (efecto sobre la estabilidad).

4.5.1.1. Efecto de NaCl y bactericida en la actividad proteolítica

En la Figura 19 se muestran los resultados del ensayo de actividad (Figura 18 A) y de estabilidad (Figura 18 B) de las proteasas extraídas del LAH en presencia de tres concentraciones de NaCl que incluye la usada en el proceso de remojo estándar.

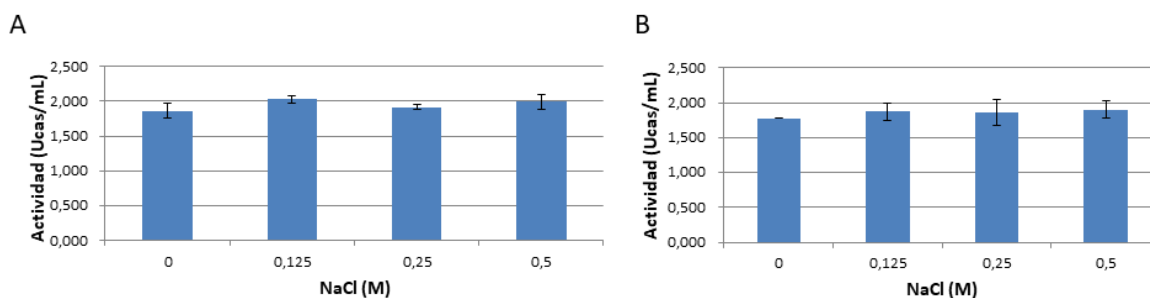


Figura 19: Ensayos de A) actividad y B) estabilidad sobre la proteasa en presencia de NaCl. Se representa la media \pm DE.

Se puede observar que no se vio afectada la actividad proteolítica en ninguno de los dos ensayos en presencia de NaCl.

En la Figura 20 se muestran los resultados del ensayo de actividad (Figura 20 A) y de estabilidad (Figura 20 B) de las proteasas extraídas del LAH, en presencia de tres concentraciones de bactericida.

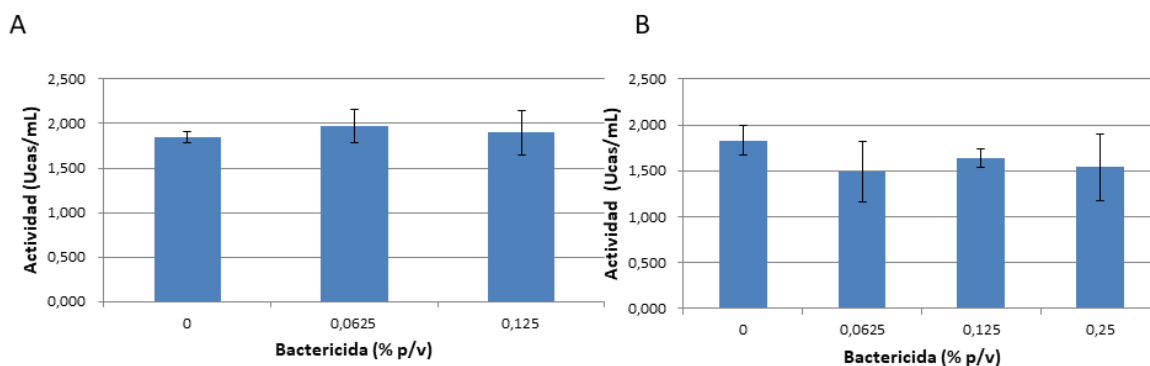


Figura 20: Ensayos de A) actividad proteolítica y B) estabilidad de la proteasa en presencia de bactericida. Se representa la media \pm DE.

Se puede observar que la actividad proteolítica no se vio modificada por efecto del bactericida en las concentraciones ensayadas (Figura 20 A). Aunque en la Figura 20 B pareciera haber una disminución en la actividad proteolítica luego de incubar las muestras 1 h con las tres concentraciones ensayadas del bactericida, sólo representa apenas un 17% y los valores estarían dentro del rango del error medido. En todos los casos, la actividad caseinolítica es de $1,95 \pm 0,08$.

4.5.1.2. Efecto de NaCl y bactericida en la actividad lipolítica

Para evaluar el efecto del NaCl y del bactericida sobre la actividad lipolítica, así como sobre la estabilidad de la lipasa, se usó sólo la concentración de NaCl y de bactericida empleadas en el ensayo habitual de remojo debido a la disponibilidad del LAH.

En la Figura 21 se representa los resultados del ensayo de actividad (Figura 21 A) y de estabilidad (Figura 21 B) de la lipasa en presencia de NaCl.

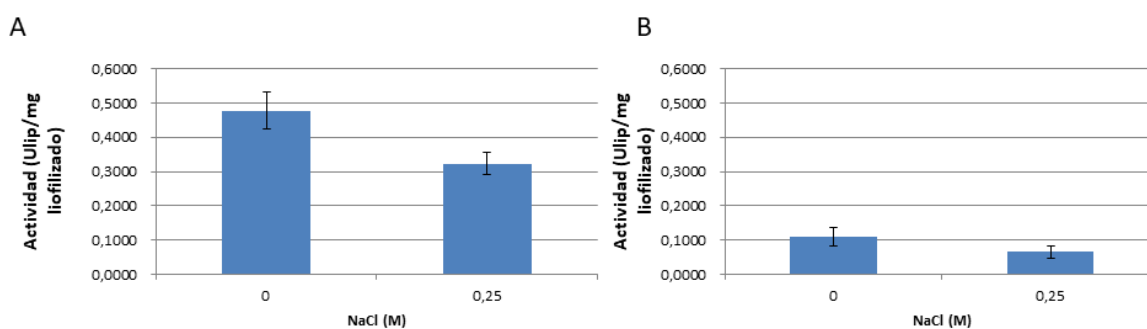


Figura 21: Ensayos de A) actividad lipolítica y B) estabilidad de la lipasa en presencia de NaCl. Se representa la media \pm DE.

A partir del gráfico de la Figura 21 A se puede inferir que el NaCl disminuye la actividad de las lipasas en un 40%, mientras que del gráfico de la Figura 19 B se puede observar una disminución en la actividad lipolítica alrededor de un 50% luego de incubar el LAH durante 1 h en presencia de NaCl 0,25 M. Otro aspecto a destacar es que la incubación durante 1 h del LAH en agua destilada (columna 0, del gráfico de la Figura 20. B) parece afectar la estabilidad de la lipasa ya que la actividad lipolítica disminuyó hasta un 24% respecto a la actividad del LAH sin incubar.

En la Figura 22 se exponen los resultados del ensayo de actividad (Figura 21 A) y estabilidad (Figura 21 B) de la lipasa del LAH en presencia de bactericida 0,125% p/v.

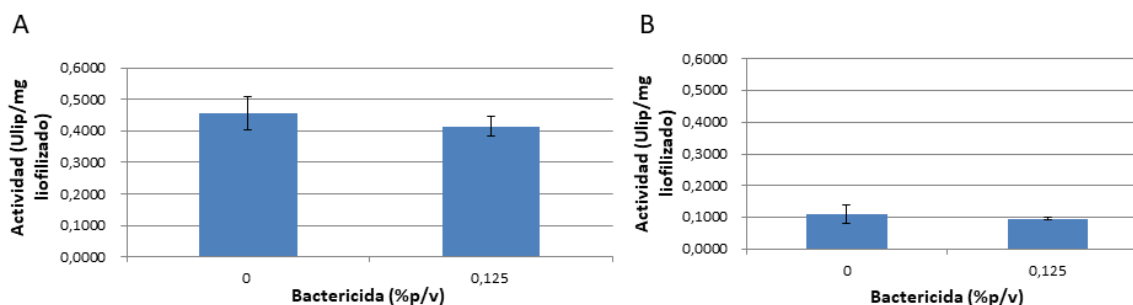


Figura 22: Ensayos de A) actividad y B) estabilidad sobre la lipolítica al bactericida. Se representa la media \pm DE.

En este caso, el bactericida no parece afectar ni la actividad lipolítica ni la estabilidad de las lipasas del LAH. Sin embargo, en este ensayo se observa lo mismo que lo observado en el gráfico de la Figura 21. B, que la incubación del LAH durante 1 h en agua disminuye la actividad lipolítica que en este caso fue de un 23 %.

Por lo tanto, se puede concluir que la lipasa es la enzima del LAH que más se verá afectada al ser incubada en presencia de bactericida y NaCl en las concentraciones empleadas en el proceso habitual de remojo.

4.5.2 Evaluación de LAH como agente remojante de pieles de carpincho

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- grado de humectación (% de aumento en el peso inicial de la piel)
- grado de apertura de las fibras (% de aumento en el espesor de la piel inicial)
- concentración de ácidos grasos y de proteínas en el líquido de remojo

Como control negativo del líquido de remojo se empleó agua y bactericida 0,125% p/v, mientras que como control positivo se ensayó una formulación estándar que consistió en NaCl 0,25 M, bactericida 0,12% p/v y surfactante 0,25% p/v. Por otro lado, se ensayaron dos relaciones masa/volumen de LAH, la cuales consistieron en 1 y 2 mg/mL

4.5.2.1 Grado de humectación

En la Figura 23, se muestran los porcentajes de humectación obtenidos para cada una de las condiciones de remojo ensayadas.

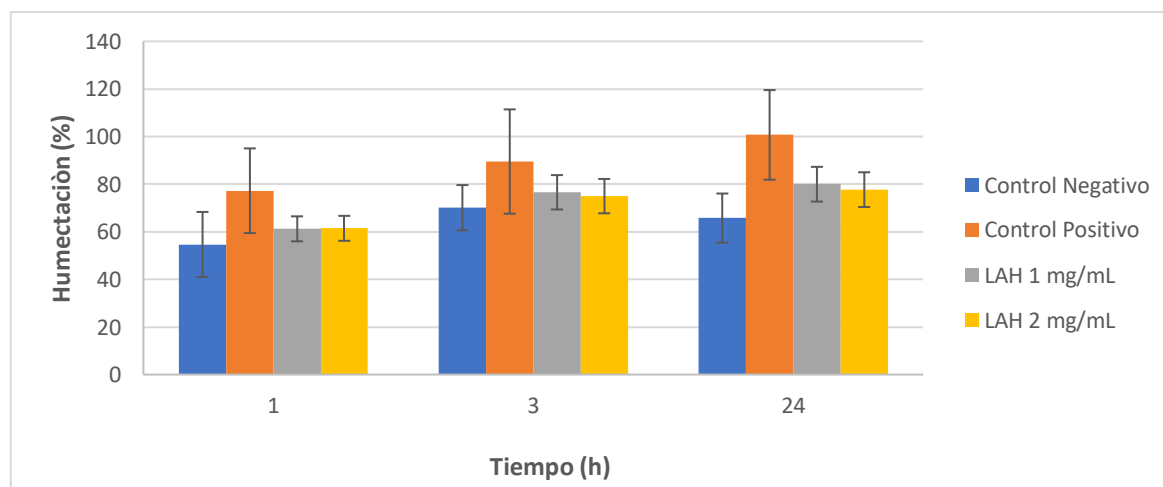


Figura 23. Porcentaje de humectación en función del tiempo de remojo a 20 °C. Se representa la media \pm DE.

Se puede observar un aumento en el porcentaje de humectación con el tiempo para los controles, así como para las dos concentraciones de enzima. Por otro lado, las enzimas muestran el mismo porcentaje de humectación para las concentraciones ensayadas y con valores intermedios entre los controles positivo y negativo. Sin embargo, las dispersiones asociadas a las medidas no permiten asegurar dichas observaciones.

4.5.2.2 Grado de apertura de las fibras

En la Figura 24 se muestran las fotos de las imágenes registradas con la lupa de los cortes de piel de carpincho (aumento 25x) a los distintos tiempos del ensayo de remojo para los controles positivo, negativo, LAH 1 mg/mL y LAH 2 mg/ mL. Mediante el software asociado a la cámara se midieron los espesores de dichas pieles y con estos valores se calcularon los porcentajes de apertura de las fibras.

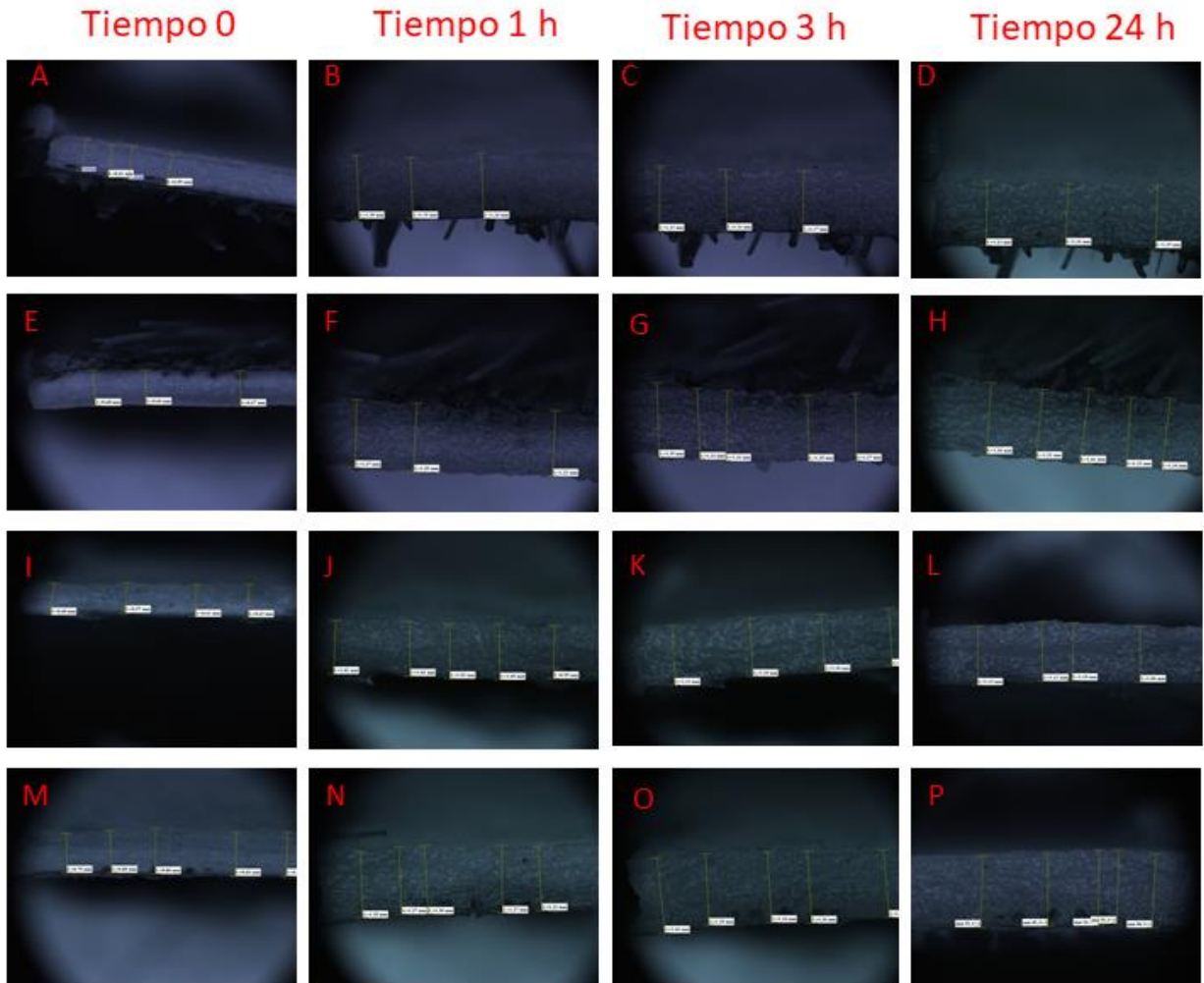


Figura 24. Imágenes de cortes de piel de carpincho a 0, 1, 3 y 24 h de remojo para el control negativo (A, B, C, D), control positivo (E, F, G, H), LAH 1 mg/mL (I, J, K, L) y LAH 2 mg/mL (M, N, O, P). Aumento: 25x.

En la Figura 25 se muestran los porcentajes de aumento del espesor (grado de apertura de las fibras) de la piel para distintos tiempos de remojo.

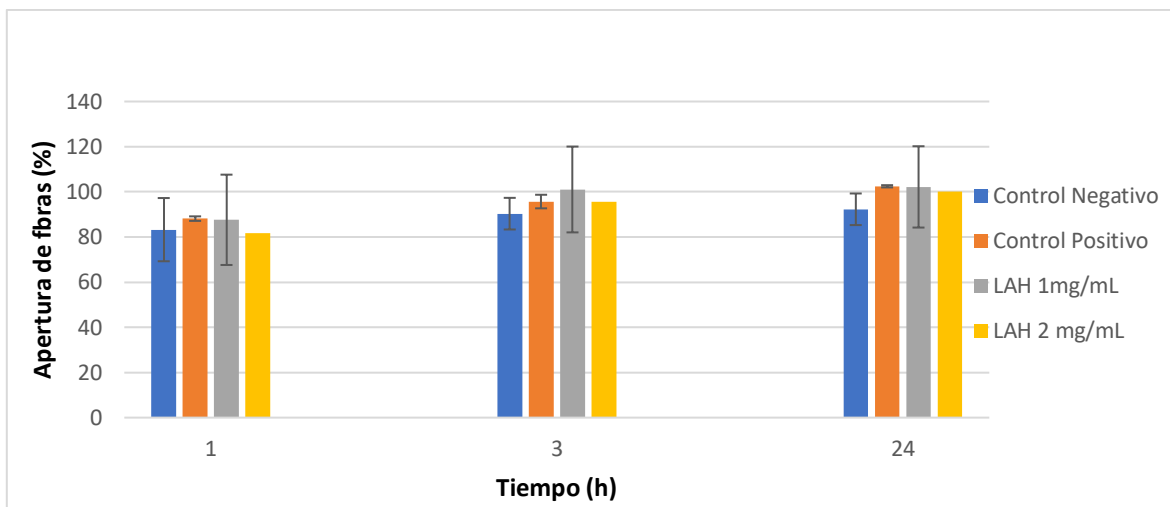


Figura 25: Porcentaje de aumento del espesor en función del tiempo de remojo a 20 °C. Se representa la media \pm DE.

Se puede observar que no existen diferencias significativas entre las condiciones ensayadas a los distintos tiempos. No obstante, parece haber una tendencia a que el porcentaje en el aumento del espesor aumente con el tiempo de remojo, siendo más notorio en las primeras 3 h.

4.5.2.3. Concentración de ácidos grasos y de proteínas en el líquido de remojo

Los valores de porcentaje de humectación, así como de apertura de fibras de los controles no mostraron diferencias significativas con respecto a los de LAH. Sin embargo, estos parámetros no son concluyentes para evaluar la acción de un agente remojuante, ya que nada dicen de su capacidad para eliminar lípidos, proteínas no fibrosas y disposición microscópicas de las fibras de colágeno.

Debido a ello, también se decidió cuantificar la cantidad de ácidos grasos y proteínas liberadas al medio de remojo.

En la Figura 26 se representa la Abs715 correspondiente al ensayo de cuantificación de ácidos grasos del líquido del ensayo de remojo luego de 24 h.

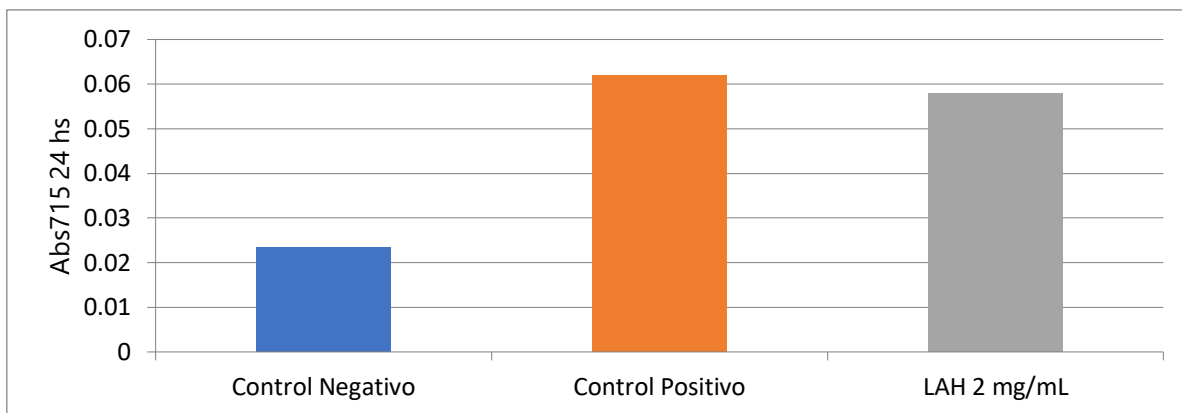


Figura 26: Abs715 (ensayo de cuantificación de ácidos grasos) del líquido del ensayo de remojo luego de 24 h.

Los valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de cuantificación de ácidos grasos del líquido de remojo fueron muy bajos y del orden del error de medida del espectrofotómetro. Por otro lado, dichos valores están por debajo del rango usado para la confección de la curva de calibración, de forma que se hace imposible poder calcular la concentración de ácidos grasos. Es necesario nuevos ensayos que permitan poner a punto la metodología de manera tal de aumentar la sensibilidad. Debe tenerse en cuenta que, a partir de datos obtenidos previamente (4.5.1.2) parece ser que la estabilidad de la lipasa disminuye con la incubación, siendo una limitante en el método.

En la Figura 27 se muestran los valores de concentración de proteínas del líquido de remojo en función del tiempo. Para el caso de los líquidos de remojo de los tratamientos con LAH, el valor de concentración de proteínas fue corregido restándole la concentración de proteínas medida para la misma proporción de LAH en agua, pero sin el agregado de la piel.

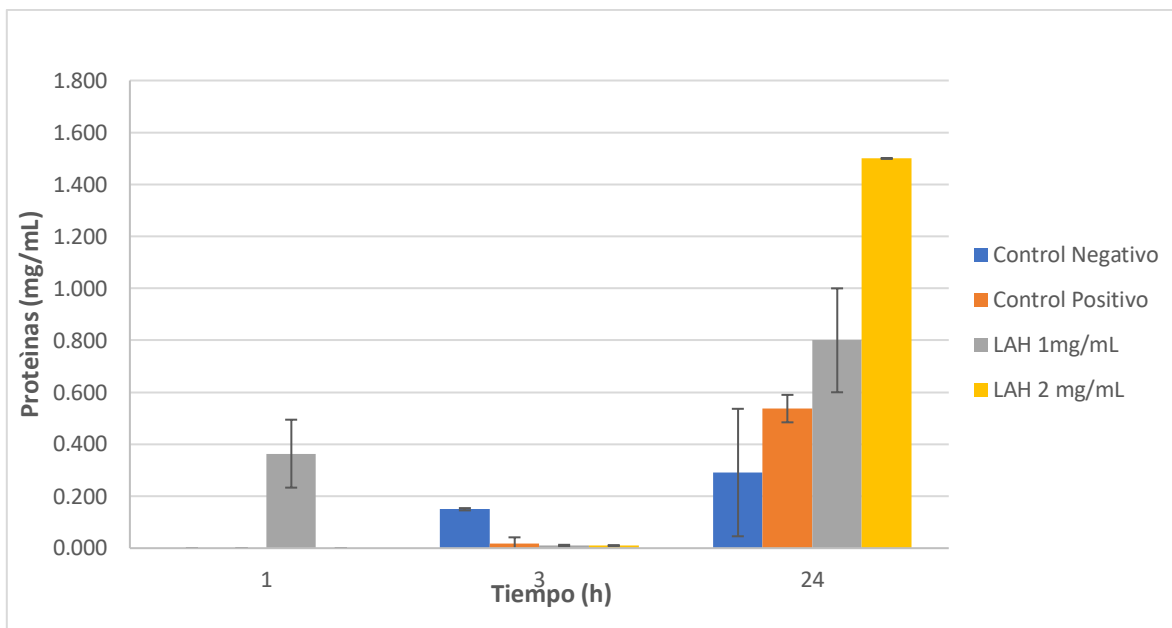


Figura 27: Cuantificación de proteínas sobre las tres alícuotas tomadas durante las 24 h. Se representa la media \pm DE.

Se puede observar que ha habido liberación de proteínas luego de 24 h de remojo tanto para los controles como para las dos concentraciones de LAH ensayadas. Sin embargo, LAH solubilizó mayor cantidad de proteínas que el control positivo, siendo la concentración de 2 mg/mL la más efectiva.

Al realizar una comparación de los valores de proteína liberada (Figura 27) con los porcentajes de humectación (Figura 23) y de apertura de fibras (Figura 25), se puede concluir que, si bien LAH no mejoraría la velocidad de humectación con respecto al estándar, sí lograría una mayor eliminación de proteínas globulares, lo cual redundaría en una piel mejor preparada para los posteriores pasos del proceso de curtido. Para corroborar esta posible ventaja se requerirán nuevos ensayos que involucren el tratamiento integral de la piel hasta su transformación en cuero propiamente dicho. Debe tenerse en cuenta que el paso de remojo es el primero del largo proceso de curtido que la piel debe atravesar hasta transformarse cuero.

5. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 3,2450 g de látex liofilizado a partir del látex extraído de 20 frutos verdes de *Araujia sericifera*, y 2,7679 g de fracción insoluble a partir de 23 frutos obtenidos del látex de frutos verdes obtenidos de la misma especie.
- Se observó que tanto la fracción insoluble del látex, como la fracción completa presentan actividad lipolítica, siendo mayor la del FIL.
- Se observó que tanto la fracción insoluble del látex, como la fracción completa presentan actividad proteolítica, siendo los valores de actividad similares entre sí.
- Las condiciones óptimas de extracción de las proteasas a partir del LAH son: buffer cítrico 0,1 M – citrato 0,1 M de pH 4,2, a 0 °C durante 45 min o más para una relación masa/volumen igual a 1,7 mg/mL.
- Se determinó para el LAH que las Ucas/mg de liofilizado es igual a $0,9 \pm 0,1$, mientras que las Ucas/mg de proteínas (actividad específica) es igual a $1,9 \pm 0,1$ para 35 °C y a pH 8.
- El LAH presenta una actividad albuminolítica de 240 ± 90 , una actividad colagenolítica de 500 ± 30 y una actividad queratinolítica de $0,9 \pm 0,2$ para 35 °C y a pH 8.
- Con respecto al remojo, el NaCl y el bactericida no parece afectar ni a la actividad ni a la estabilidad de las proteasas. En cambio, la incubación en agua destilada a temperatura ambiente (20 °C) durante 1 h parece disminuir la actividad lipolítica. Lo mismo ocurre en presencia de NaCl. El bactericida parece no afectar a la actividad ni a la estabilidad de las lipasas.
- Con respecto al porcentaje de hidratación y al porcentaje de apertura de la fibra, no produce mejoras significativas ya que se obtuvieron valores intermedios entre el control positivo y el control negativo.
- No se detectó presencia de ácidos grasos en el agua de remojo en ninguna de las condiciones. Es necesario aumentar la sensibilidad del método para la cuantificación de ácidos grasos.
- Hubo liberación de proteínas luego de las 24 h de remojo tanto para los controles como para las dos concentraciones de LAH ensayadas, siendo el LAH el que solubilizó mayor cantidad de proteínas. La concentración de 2 mg/mL de LAH resultó ser la más efectiva.

6. PERSPECTIVAS

- Evaluar la existencia de proteasas inmovilizadas en las gomas del látex, de la misma manera que se realizó con las lipasas.
- Evaluar la actividad depilante de las proteasas del látex.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del componente del látex.
- Poner a punto un método confiable para la cuantificación de ácidos grasos a partir de las aguas de remojo.

7. BIBLIOGRAFIA

A. Dettmer, M. A. Z. Ayub and M. Gutterres (2011). "*Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather manufacture*". Braz. J. Chem. Eng. vol.28 no.3 São Paulo July/Sept. 2011

Alberto R. Angelinetti; Carlos S. Cantera. "*Remojo, depilado y sus aguas residuales: problemas y soluciones*". CITEC, CIC - INTI

Altan Afsar & Fatma Cetinkaya (2008). "*Studies on the degreasing of skin by using enzyme in liming process*". Indian Journal of Chemical Technology 15(5)

Anastas, P. T., Warner, J. C. (1998). "*Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press*". Oxford University Press. New York. p. 30.

Benjamin G. Davis and Viviane Boyer (2001). "*Biocatalysis and enzymes in organic synthesis*". Nat Prod Rep. 2001 Dec;18(6):618-40

Blakesley, R.W.; Boezi, J.A. "A new Staining Technique for Proteins in Polyacrylamide Gels Using Coomassie Brilliant Blue G250" Anal Biochem 1977, 82 (2), 580-582

Cantera, C. S., Goya, L., Galarza, B., Garro, M. L., & López, L. M. I. (2003). "*Hair saving unhairing process. Part 5. Characterisation of enzymatic preparations applied in soaking and unhairing processes*". Journal of the society of leather technologists and chemists (vol 87 nro 2 mar.-abr.2003) 69-77

Di Santo Meztler, Paula (2012). "*Caracterización biocatalítica de una lipasa naturalmente inmovilizada encontrada en Araujia sericifera*". Tesina de grado. LIPROVE. FCE-UNLP.

Dimitri, M.J. (1978). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Editorial Acme SACI, Buenos Aires, pp 774 - 780

Errasti, M. E., Caffini, N. O., & López, L. M. I. (2018). "*Proteolytic extracts of three Bromeliaceae species as eco-compatible tools for leather industry*". Environ Sci Pollut Res (2018) 25: 21459.

Gratacos, E., Boleda, J., Portavella, M., Adzet, M., Lluch, G. (1962). "Tecnología Química del Cuero". Emporium. Barcelona.

János András Mótyán, Ferenc Tóth, and József Tőzsér (2013). "*Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology*". Biomolecules. 2013 Dec; 3(4): 923–942.

Jeanne Mager Stellman (1998). *Enciclopedia de salud y seguridad de trabajo*. Cap 88: cueros, pieles y calzados

López, L. M., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D., & Caffini, N. O. (2000). "Purification and characterization of macrodonta I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodonta* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)". *Journal of Food Biochemistry*, 19: 443-454.

Morcelle, S.R., S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Aviles & N.S. Priolo (2004) "Funastrain c II: a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*" *Protein J.*, 23: 205-15.

Obregón, David Walter (2008). "Hidrolasas de látex de especies del género *Araujia*. Purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas". Tesis Doctoral. LIPROVE. FCE-UNLP

Obregón, W. D., Arribére, M. C., Del Valle, S. M., Liggieri, C., Caffini, N., & Priolo, N. (2001). "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J Protein Chem* (2001) 20: 317.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T. (1999). "Biochem: The realm of microbial lipases in biotechnology". *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29 (Pt 2)(2):119-31

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

Thorstensen, TC (1985). "Practical leather technology". Malabar, FL, US: Robert E. Krieger Publishing Company

Valsecchi, M and Fiorio (1978). "Operating Cycle in the tanning industry and related risks". *Securities* 63:132-144