

Identificación de la actividad proteolítica en especies vegetales presentes en las provincias de Loja y Pastaza

Christian Gómez, Marco Sinche, Jessica Duchicela, Ricardo Muñoz y Patricio Castillo

Laboratorio de Investigaciones Aplicadas

Departamento de Ciencias Nucleares

patricio.castillo@epn.edu.ec

Resumen

Se investigó la actividad proteolítica en diferentes órganos de especies vegetales presentes en las provincias de Loja y Pastaza. El objetivo fue determinar el órgano vegetal o el látex con la mayor actividad proteolítica, en cada provincia en estudio, para posibles aplicaciones medicinales o industriales. En total, se analizaron 95 muestras vegetales y 6 muestras de látex. En cada muestra se determinó la concentración de proteína, la actividad proteolítica, el porcentaje de hidrólisis y la actividad específica. Para la provincia de Loja, la muestra vegetal más activa correspondió al extracto semipurificado de las ramas del higuerón (*Ficus apollinaris* Dugand, Moraceae), con una actividad caseinolítica de 11.10 UE /mL y la muestra de látex más activa fue obtenida del toronche (*Vasconcella pubescens* Lenné & Koch, Caricaceae), con una actividad de 7.93 UE /mg de látex seco. Para la provincia de Pastaza, la muestra vegetal con la mayor actividad proteolítica fue la corteza de la uña de gato (*Uncaria tomentosa* Willd, Rubiaceae) con un valor de 2.65 UE /mL de extracto semipurificado y la muestra de látex más activa fue obtenida del higuerón (*Ficus apollinaris* Dugand, Moraceae), con un valor de 4.90 UE /mg de látex seco. Todas las muestras de las especies mencionadas se pueden considerar como fuentes potenciales de enzimas proteolíticas.

Palabras claves: actividad caseinolítica, grado de hidrólisis, actividad específica, muestras vegetales, muestras de látex.

Abstract

Proteolytic activity was investigated in different organs and latex samples from common plants from Loja and Pastaza provinces for possible medicinal or industrial applications. Ninety five vegetal samples and 6 latex samples were analyzed. Protein concentration, caseinolytic activity, hydrolysis degree and specific activity were determined for each sample. For the samples from Loja province, the most active samples corresponded to the semi-purified extract from branches of higueron (*Ficus apollinaris* Dugand, Moraceae), with 11.10 EU/mL of caseinolytic activity and the latex obtained from toronche (*Vasconcella pubescens* Lenné & Koch, Caricaceae) with an activity of 7.93 EU/mg dry latex. For Pastaza province, the semi-purified extract prepared from bark of cat's claw (*Uncaria tomentosa* Willd, Rubiaceae) presented the highest proteolytic activity with 2.65 EU/mL together with the latex obtained from higueron (*Ficus apollinaris* Dugand, Moraceae) with a caseinolytic activity of 4.90 EU/mg dry latex. All samples from both species might be considered as potential sources of proteolytic enzymes.

Keywords: caseinolytic activity, hydrolysis degree, specific activity, vegetal samples, latex samples.

1 Introducción

Las proteasas tienen gran importancia en varios procesos biológicos, como la coagulación sanguínea, la muerte celular, la diferenciación de tejidos, el metabolismo, el transporte de las proteínas a través de las membranas celulares y la activación de otras enzimas [5]. Estas enzimas son utilizadas en diferentes procesos industriales, tales como en las industrias alimenticia, farmacéutica, textil, en la formulación de detergentes, en las curtiem-

bres y en los procesos de biorremediación, debido a su eficacia, acción específica y a su alta biodegradabilidad [5], [10].

Las enzimas proteolíticas pueden ser obtenidas de diversas fuentes naturales. Como el Ecuador posee una alta y, hasta cierto punto, inexplorada biodiversidad vegetal, se desarrolló este proyecto de investigación para identificar la presencia de enzimas proteolíticas en espe-

cies vegetales comunes en las provincias de Loja y Pastaza. Dichas proteasas podrían ser empleadas en posibles aplicaciones medicinales o industriales.

2 Materiales y métodos

2.1 Recolección de especies vegetales

Las muestras provinieron fundamentalmente del Parque Nacional Podocarpus, del banco vivo y de la estación agroecológica de la Universidad Técnica Particular de Loja en la provincia de Loja, y del Parque Etnobotánico Omaere en la provincia de Pastaza.

Las muestras recolectadas se identificaron con un nombre común, el nombre científico, la ubicación del muestreo, las características y los usos de las especies en la zona. Se lavaron con agua destilada, se secaron con papel absorbente, se colocaron en bolsas plásticas, se etiquetaron y se almacenaron en refrigeración hasta su utilización en máximo 30 días posteriores.

2.2 Preparación de las muestras

Para la preparación del extracto vegetal, se utilizaron alrededor de 15 g de muestra, que fue homogenizada por 3 min, con tampón fosfato de sodio, 50 mmol/L, pH 7.5, en una relación de 1 : 3 (peso de muestra vegetal: volumen de tampón). El extracto obtenido se filtró y luego se centrifugó por 20 min, a 2147 g, en una centrífuga DAMON, modelo IEC HN-S.

Para obtener el extracto semipurificado, se realizó una precipitación de las proteínas presentes en el extracto crudo con etanol. Se emplearon 1000 μ L de extracto, estabilizado con 50 μ L de solución de NaCl 4 mol/L, y se precipitó mediante la adición de 2000 μ L de etanol, al 96%. La proteína precipitada se separó por centrifugación a 2716 g, por 5 min; se dejó secar y luego se resuspendió y homogenizó en 2000 μ L de tampón fosfato diácido de sodio, 50 mmol/L, pH 7.5 [9].

En el caso de las muestras de látex, los látex frescos fueron secados en una estufa Cenco (U.S.A.), a 42 °C, por alrededor de 12 h. Las muestras secas se colocaron en tubos Eppendorff y se almacenaron en refrigeración hasta su utilización en los 15 d siguientes.

2.3 Determinación de la concentración de proteína

Para determinar la concentración de proteína en los extractos vegetales, se utilizó el método espectrofotométrico. La muestra fue preparada previamente, con 100 μ L de extracto semipurificado diluido en tampón fosfato de sodio 50 mmol/L y pH 7.5. La lectura de la densidad óptica de las muestras fue a 280 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 [3].

La concentración proteica en los extractos de látex, se determinó con el método de Lowry *et al.* (1951). Para obtener los extractos, se maceraron 0.005 g de látex seco en

2 mL de tampón Tris HCl 50 mmol/L y pH 8. Se construyó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (SIGMA, U.S.A.) como estándar. La lectura de la DO fue realizada a 650 nm (Martínez, 2005).

2.4 Determinación de la actividad proteolítica

En los extractos vegetales, la actividad proteolítica fue determinada por incubación a 37 °C, durante 20 min, de 0.1 mL de extracto semipurificado con 1.1 mL de solución de caseína al 1%, preparada en tampón fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 7.5. Para detener la reacción, se adicionaron 1.8 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Luego se realizó una centrifugación a 2716 g, durante 30 min y se determinó la DO₂₈₀ del sobrenadante [8], [7].

Una unidad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir la elevación de 0.1 mg/mL de caseína hidrolizada, en la mezcla de reacción, utilizada para medir la actividad durante 20 min de incubación [8].

La actividad proteolítica en las muestras de látex fue determinada según el método descrito por Núñez (2007). Para lo cual, 0.005 g de látex seco con 1 mL de tampón Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8, y 1 mL de solución de caseína al 1% en tampón fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 7.5, fueron incubados a 37 °C durante 30 min. Se detuvo la reacción con 3 mL de TCA al 5% y se realizó una nueva incubación a 25 °C, durante 30 min. Entonces, se centrifugó la mezcla por 30 min a 2716 g y se leyó la DO₂₈₀ del sobrenadante [7].

En el caso de las muestras de látex, la unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir la elevación de 0.15 unidades en la densidad óptica de la mezcla de reacción, al cabo de 30 min de incubación [8].

2.5 Determinación de la actividad específica

La actividad específica, tanto para los extractos vegetales como para las muestras de látex, fue determinada mediante la división de la actividad caseinolítica para la concentración de cada muestra o extracto. La actividad enzimática fue expresada en unidades enzimáticas por mg de proteína [2].

2.6 Grado o porcentaje de hidrólisis (GDH)

El GDH fue encontrado mediante la relación entre la concentración de proteína determinada en el sobrenadante, luego de la hidrólisis y la concentración de proteína en la solución inicial de caseína, utilizada en el ensayo [7].

3 Resultados y discusión

3.1 Muestras vegetales de la provincia de Loja

Se analizaron 80 muestras vegetales, procedentes de la provincia de Loja, de las cuales 30 no mostraron actividad proteolítica.

La Tabla 1 presenta la concentración de proteína de las muestras de mayor concentración proteica, que no mostraron actividad proteolítica.

Tabla 1. Resultados de la concentración de proteína para muestras vegetales sin actividad de la provincia de Loja

Muestra	Código	Concentración de proteína (mg/mL extracto)
Rama de Vainillo	VainilloR	6.44
Fruto de Matapalo ⁽²⁾	Matapalo2FR	6.70
Raíz de Niguilla	NiguillaRZ	6.87
Flor de Matico ⁽³⁾	Matico3FL	8.15
Rama de Matico ⁽³⁾	Matico3R	9.50
Hoja de Lechero	LecheroH	9.84
Hoja de Matico ⁽³⁾	Matico3H	15.80
Hoja de Matapalo ⁽²⁾	Matapalo2H	15.90
Hoja de Niguilla	NiguillaH	20.09
Vaina de Vainillo	VainilloVN	31.78

Las Figuras 1, 2, 3 y 4 presentan la concentración de proteína, la actividad proteolítica, el porcentaje o grado de hidrólisis y la actividad específica para las 10 muestras, procedentes de la provincia de Loja, que presentaron los valores más altos.

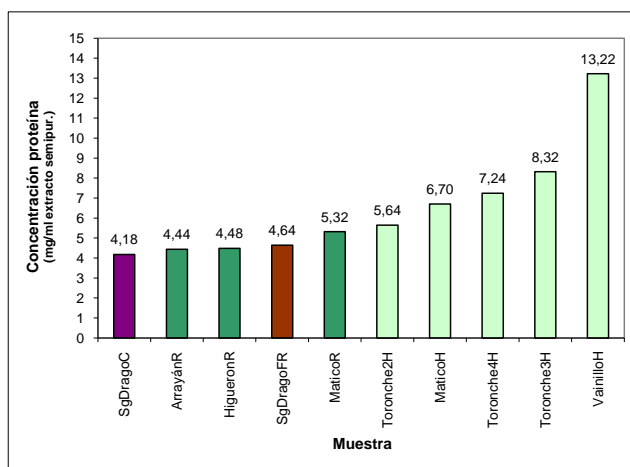


Figura 1. Concentración de proteína de las muestras vegetales de la provincia de Loja, con actividad proteolítica

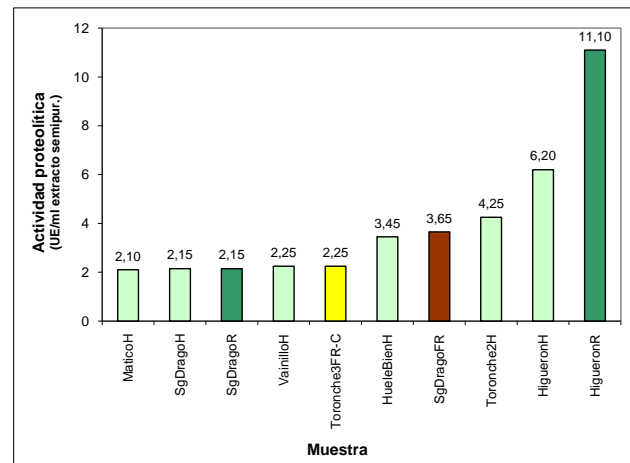


Figura 2. Actividad proteolítica de las muestras vegetales más activas de la provincia de Loja

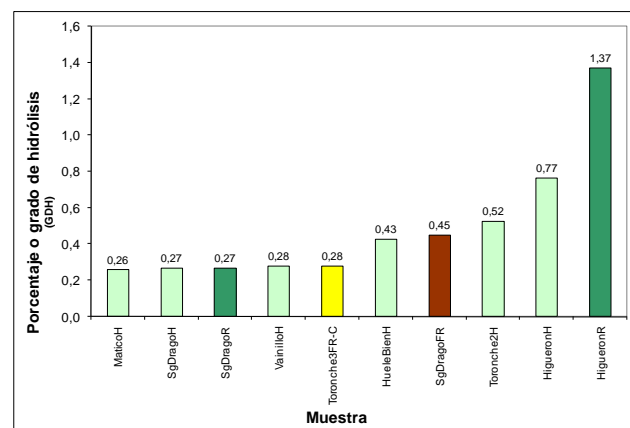


Figura 3. Grado de hidrólisis de caseína de las muestras vegetales más activas de la provincia de Loja

De las muestras de Loja, el extracto de las ramas de higuero (*Ficus apollinaris* Dugand) presentó la actividad proteolítica y el grado de hidrólisis más elevados, con valores de 11.10 UE /mL y 1.39 %, respectivamente.

De las muestras recolectadas en la provincia de Loja, la corteza del fruto de toronche (*Vasconcella x heilbornii* Badillo), con un valor de 17.05 UE /mg de proteína, presentó la mayor actividad específica, aunque no sea de las muestras más activas, como se ve en la Figura 2, gracias a su muy baja concentración proteica (0.132 mg/mL). El alto valor de la actividad proteolítica específica indicaría que dicha muestra presenta un elevado grado de pureza y que las proteasas presentes en ella son las más activas.

3.2 Muestras vegetales de la provincia de Pastaza

Se analizaron 15 muestras vegetales, procedentes de la provincia de Pastaza, de las cuales 4 no presentaron actividad proteolítica. La concentración de proteína de las muestras sin actividad, se presenta en la Tabla 2 y Los resultados de los análisis enzimáticos, para las muestras

vegetales activas de la provincia de Pastaza, se presentan en las Figuras 5, 6, 7 y 8.

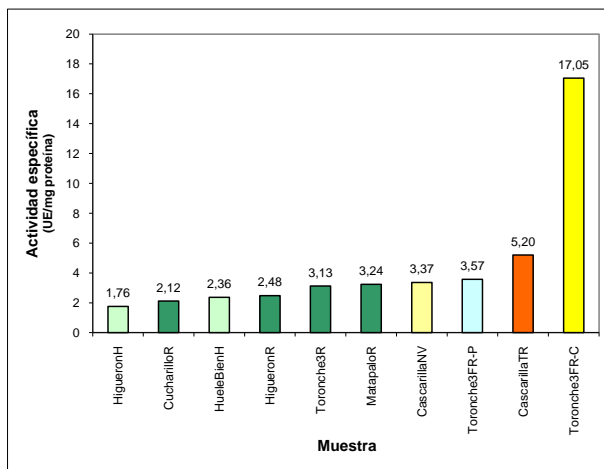


Figura 4. Actividad específica de las muestras vegetales más activas de la provincia de Loja

Tabla 2. Resultados de la concentración de proteína para muestras vegetales sin actividad de la provincia de Pastaza

Muestra	Código	Concentración de Proteína (mg/mL extracto)
Fruto de Duco	DucoFR	0.025
Hoja de Pomarosa	PomarosaH	0.093
Flor de Duco	DucoFL	0.184
Rama de Uña de gato génesis	UñaGatoGenR	1.090

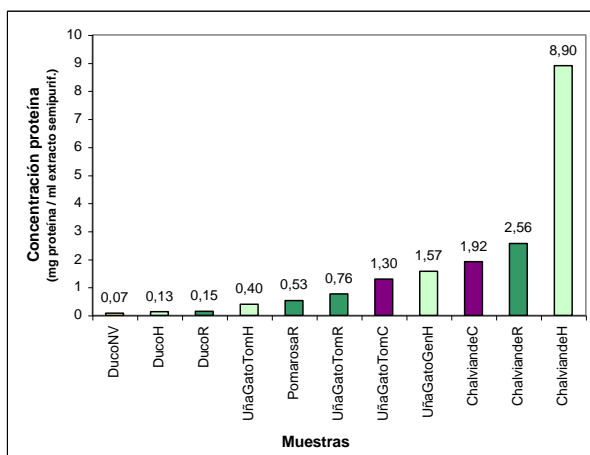


Figura 5. Concentración de proteína de las muestras vegetales de la provincia de Pastaza, con actividad proteolítica

La mayor concentración de proteína encontrada en las muestras de la provincia de Pastaza, se presentó en las hojas de chalviande (*Virola dixonii* Little), con un valor de 8.90 mg de proteína por mL de extracto semipurificado.

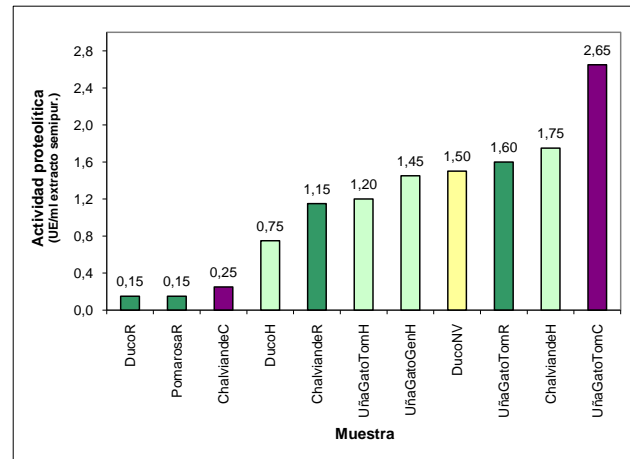


Figura 6. Actividad proteolítica de las muestras vegetales colectadas en la provincia de Pastaza

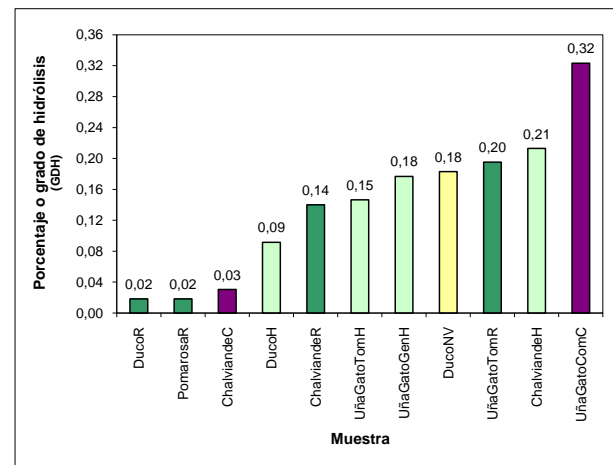


Figura 7. Grado de hidrólisis de caseína de las muestras vegetales colectadas en la provincia de Pastaza

En la muestra de la corteza de uña de gato comercial (*Uncaria tomentosa* Willd), se presentaron los mayores valores de actividad proteolítica y de porcentaje de hidrólisis, con 2.65 UE /mL y 0.32 %, respectivamente.

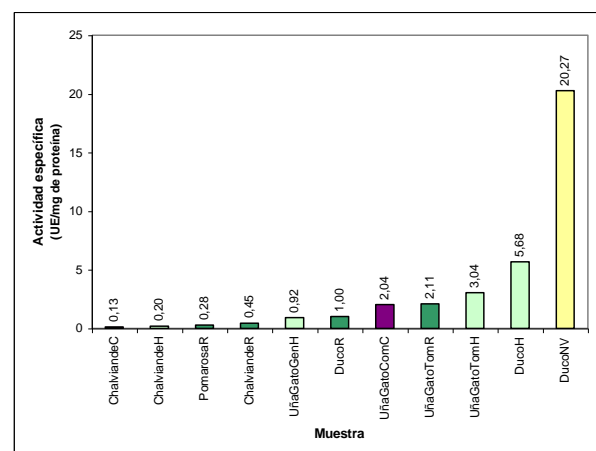


Figura 8. Actividad específica de las muestras vegetales colectadas en la provincia de Pastaza

La mayor actividad específica fue encontrada en las nervaduras de duco (*Clusia sp.*), con un valor de 20.27 UE /mg, a pesar de que en la actividad proteolítica, como en el grado de hidrólisis, esta muestra se ubica en cuarto lugar, entre las más activas, como se ve en las figuras 6 y 7; pero, se ubica en el décimo primer lugar, entre las muestras con mayor contenido proteico, con apenas 0.07 mg/mL de extracto semi-purificado, lo que explica su mayor actividad específica, por encima de las de otras muestras, como de uña de gato y de chalviande [2].

3.3 Muestras de látex de la provincia de Loja

Los resultados obtenidos con las 4 muestras de látex, recolectadas en la provincia de Loja, se presentan en las Figuras 9, 10, 11 y 12, en las que se muestran los valores de concentración de proteína, actividad proteolítica, grado de hidrólisis y actividad específica.

El látex del toronche (*Vasconcella pubescens*) presentó los más altos valores de concentración proteica, actividad proteolítica, porcentaje de hidrólisis y actividad específica, con valores de 0.67 mg de proteína por mg de látex seco, 7.93 UE /mg, 69.63 % y 11.92 UE /mg, respectivamente.

En este caso, el látex de toronche posee las cantidades necesarias de actividad proteolítica y concentración proteica que garantizan que la misma muestra posea la más alta actividad total y específica. El alto grado de hidrólisis alcanzado, de 69.63 %, reflejaría la alta especificidad de las proteasas presentes por la composición aminoacídica de la caseína [2].

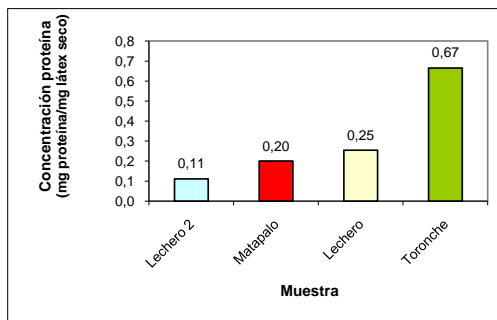


Figura 9. Concentración de proteína en muestras de látex recolectadas en la provincia de Loja

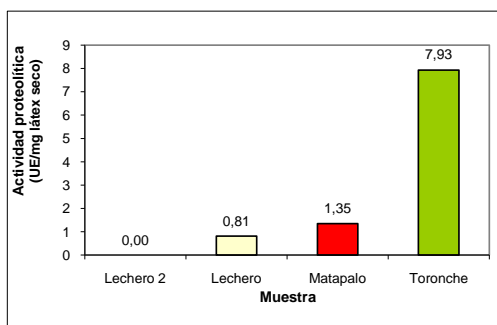


Figura 10. Actividad proteolítica en muestras de látex recolectadas en la provincia de Loja

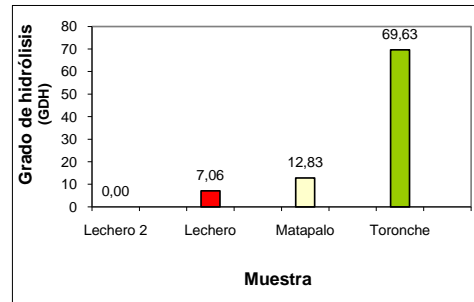


Figura 11. Grado de hidrólisis en muestras de látex recolectadas en la provincia de Loja

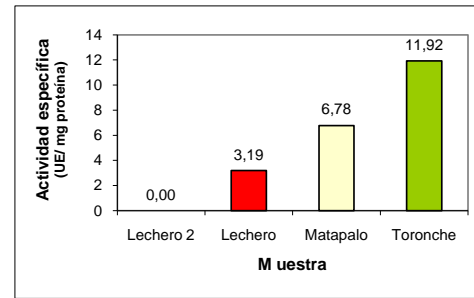


Figura 12. Actividad específica, en muestras de látex, recolectadas en la provincia de Loja

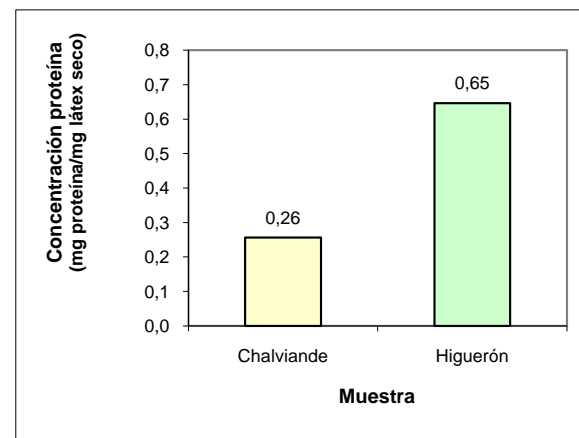


Figura 13. Concentración de proteína en muestras de látex recolectadas en la provincia de Pastaza

3.4 Muestras de látex de la provincia de Pastaza

En las Figuras 13, 14, 15 y 16 se muestran los resultados de la concentración de proteína, la actividad proteolítica, el porcentaje de hidrólisis y la actividad específica, obtenidos para las 2 muestras de látex tomadas en la provincia de Pastaza.

El látex de higuieron (*Ficus apollinaris* Dugand) presentó los valores más elevados en concentración de proteína, actividad proteolítica y porcentaje de hidrólisis, mientras que el látex de chalviande (*Virola dixonii* Little) mostró la más alta actividad específica, con un valor de 13.52 UE /mg de proteína, lo cual indicaría que las enzimas proteolíticas presentes en el látex de chalviande, son más activas que las del higuieron, por su mayor especificidad por la caseína, usada como sustrato, a pesar de que

la muestra de chalviande posee un 29.4% menos actividad proteolítica, pero con un 60.0% menos de contenido de proteína, que el higuierón [2].

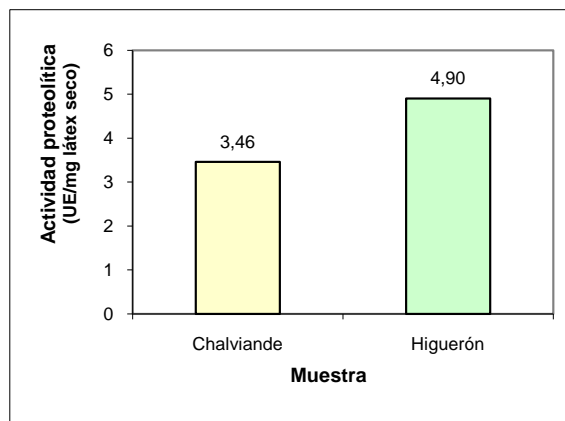


Figura 14. Actividad proteolítica en muestras de látex colectadas en la provincia de Pastaza

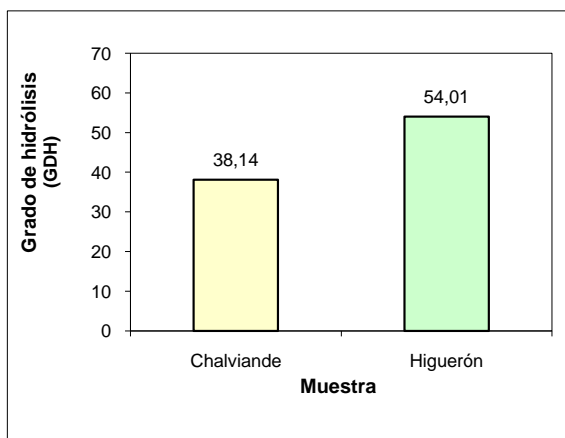


Figura 15. Grado de hidrólisis en muestras de látex colectadas en la provincia de Pastaza

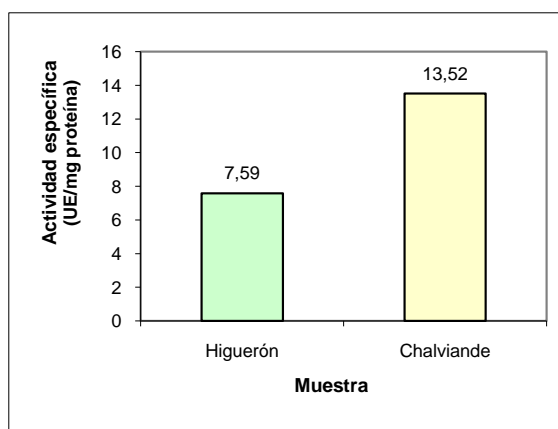


Figura 16. Actividad específica, en muestras de látex, colectadas en la provincia de Pastaza

4 Conclusiones

De las muestras de órganos vegetales, evaluadas para las provincias de Loja y Pastaza, las ramas de la especie higuierón (*Ficus apollinaris* Dugand, Moraceae, Loja),

con un valor de 11.10 UE / mL de extracto semipurificado y la corteza de la especie uña de gato comercial (*Uncaria tomentosa* Willd, Rubiaceae, Pastaza), con un valor de 2.65 UE / mL de extracto semipurificado, presentaron los valores más altos de actividad proteolítica y las convierten en las mejores fuentes potenciales de enzimas proteolíticas, que podrían ser empleadas en aplicaciones medicinales o industriales. Las muestras de látex colectadas, que muestran las más altas actividades proteolíticas, son de las especies higuierón (*Ficus apollinaris* Dugand, Moraceae, Pastaza), con un valor de 4.90 UE / mL de extracto semipurificado, y toronche (*Vasconcella pubescens* Lenné & Koch, Caricaceae, Loja), con un valor de 7.92 UE / mL de extracto semipurificado, lo cual ratifica el uso medicinal del látex, de la especie Higuierón, como un cicatrizante de heridas y, en el caso del látex de la especie toronche, aunque no se atribuyó un uso doméstico en la zona de crecimiento, podría tener una aplicación en la industria alimenticia, por ejemplo.

Agradecimiento

Esta investigación se desarrolló con el auspicio del FUNDACYT, a través del proyecto EPN-PIC-111-2005 y la colaboración especial del Herbario de la Pontificia Universidad Católica de Quito.

Referencias

- [1] AEPJP, 2003. *Caricaceae*. <http://www.aepjp.com/CARICACEAE.pdf>, (jun. 2007).
- [2] Chávez, A., Díaz, J., Pérez, U. y Delfín, J., 1990. *Temas de Enzimología*. Vol. II ENPES, La Habana, Cuba.
- [3] Espinoza, R., 2003. *Aislamiento y purificación de la enzima aminoacilasa de riñón porcino (ARP)*. Proyecto previo al título de Ingeniero Químico, E.P.N., Quito, Ecuador.
- [4] Lowry, O., Rosenbrough, N., Raff, A. y Randal, R., 1951. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *Journal Biology Chem.* No. 193, pp. 265–275.
- [5] Mala, R., Aparna, T., Mohín, G. y Vasanti, V., 1998. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory, India, Vol. 62, No. 3, pp. 597–635, <http://mmbr.asm.org/cgi/content/full/62/3/597#SEC0>, (sep. 2007).
- [6] Martínez, E., 2005. *Prácticas de metodología y experimentación*. Bio-química II, Departamento de Bioquímica, Universidad de Navarra. <http://www.unav.es/bioquimica/CuadernoE-Martinez.pdf>, (sep. 2007).
- [7] Núñez, D., 2007. *Identificación de proteasas vegetales con posibles aplicaciones industriales o biomédicas a partir de especies comunes de las provincias de Bolívar y Pichincha*. Proyecto previo al título de Ingeniera Química, E.P.N., Quito, Ecuador.

- [8] Salomão, S., Sousa, C. y Fernandes, K., 2004. *Biochemical Characterization of Selected Plant Species from Brazilian Savannas*. Journal Brazilian Archives of biology and technology. <http://www.scielo.br/scielo.php>. 47, No 2, p. 253, (jul. 2007).
- [9] Señorale, M. y Martínez, C., 2005. *Bioquímica-Curso 2005*. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. <http://www.fcien.edu.uy>, (sep. 2007).
- [10] Sequeiros, C., Natalucci, L. y Dionisi, H., 2007. *Caracterización bioquímica, clonado y secuenciación de endopeptidasas de origen vegetal con aplicación industrial*. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Unidad de Investigación de Oceanografía y Meteorología, Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. <http://www.cenpat.edu.ar/fisicambien/microbamb.htm>, (ago. 2007).