

## 20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

**Aislamiento, caracterización y purificación de peptidasas cisteínicas de *Bromelia serra* Griseb. (Bromeliaceae)**Salese, Lucía; Bruno, Mariela

lusalese@gmail.com; brunomariela@biol.unlp.edu.ar

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

**Resumen**

*Bromelia serra* Griseb. (Bromeliaceae) es una especie que crece en el centro-norte de Argentina cuyos frutos poseen enzimas proteolíticas. El objetivo del presente trabajo fue obtener extractos enzimáticos, caracterizarlos y purificar de manera preliminar las principales peptidasas de esta muestra. A partir de los frutos se obtuvieron extractos cuya máxima actividad específica empleando caseína como sustrato fue de  $4,5 \pm 0,6$  Ucas/mg. Se determinó que el tipo catalítico de estas peptidasas es cisteínico, activándose un 47,5 % por el agregado de cisteína en concentración  $\geq 5$  mM. Se determinó un rango de pH óptimo con una actividad  $> 95\%$  para los valores de pH entre 6,2 y 6,7 y un tiempo de inactivación por shock térmico de 2 min a  $100^\circ\text{C}$ . Se determinó que una concentración 4M de cloruro de sodio disminuye su actividad caseinolítica a un 22 %. Estas peptidasas resultan ser estables pre-incubándolas a 23 ó  $37^\circ\text{C}$  durante 120 min, mientras que la curva de inactivación cae abruptamente luego de su exposición a  $65^\circ\text{C}$  durante 10 min. Se obtuvieron precipitados con 4 volúmenes de acetona o de etanol a  $-20^\circ\text{C}$ , los cuales al ser resuspendidos en el buffer de extracción conservaron más del 90 % de la actividad original. Por isoelectroenfoque (IEF) se detectó la presencia de 4 bandas proteicas principales, tres de las cuales resultaron ser activas al zimograma (pI 3,6, 7,0 y 7,6). Por SDS-PAGE se obtuvo una banda mayoritaria con una masa molecular de 23-25 kDa, típica de fitopeptidasas cisteínicas. Se realizó un esquema de purificación cromatográfico por exclusión molecular e intercambio iónico, detectando algunas fracciones activas compatibles con el IEF. Estas peptidasas, por las características determinadas, resultarían de interés para ser aplicadas en procesos industriales.

**Palabras clave:** *Bromelia serra*, *Bromeliaceae*, fitopeptidasa, caracterización, purificación.

## Introducción

Las enzimas proteolíticas, también denominadas proteasas o peptidasas, son aquellas hidrolasas que cortan enlaces peptídicos, se encuentran presentes en todos los organismos vivos y por su mecanismo de acción se encuentran involucradas en diversos procesos fisiológicos (Barrett *et al.*, 2004; Dickinson, 2002; Palma *et al.*, 2002). Estas enzimas son empleadas en diferentes industrias, tales como la alimentaria o la farmacéutica y constituyen más del 60 % de las enzimas comercializadas en la actualidad (Feijoo-Siota & Villa, 2011; Li *et al.*, 2013). Las proteasas aisladas de plantas cumplen los requerimientos del estatus "GRAS" (Generally Recognized As Safe), hecho facilitado ya que su fuente de origen es vegetal no tóxica. Actualmente existen varias preparaciones comerciales de uso industrial que contienen peptidasas vegetales, entre las que se destacan la ficina, la papaína y la bromelina (Maurer, 2001; Owoyele *et al.*, 2008). Esta última proviene del ananá (*Ananas comosus*, *Bromeliaceae*) y es una preparación compuesta por cuatro peptidasas de tipo cisteínico: bromelina de tallo, de fruto, ananaína y comosaína (Abdul Muhammad & Ahmad, 2017). En Argentina existen varias especies de la familia *Bromeliaceae*, subfamilia Bromelioideae que son objeto de estudio por poseer

peptidasas de elevada actividad y características favorables para su uso industrial, entre las que se encuentran *Bromelia hieronymi* (Bruno *et al.*, 2008), *B. balansae* (Pardo *et al.*, 2000), *Pseudananas macrodentes* (López *et al.*, 2000) y *B. serra* (Caffini *et al.*, 1988). Las peptidasas de algunas de estas especies han sido purificadas y caracterizadas, y se conoce que los extractos obtenidos a partir de sus frutos poseen capacidad para la preparación de hidrolizados de proteínas alimentarias, para la coagulación de leche y obtención de quesos (Bruno *et al.*, 2010). *B. serra* es una especie que crece en el norte y centro de Argentina y posee peptidasas cisteínicas que podrían ser promisorias para la industria.

## Objetivos

Los objetivos del presente trabajo incluyen la preparación de un extracto con actividad proteolítica a partir de frutos de maduración intermedia de *Bromelia serra*, la determinación de parámetros necesarios para su uso industrial, la purificación preliminar por precipitación con solventes orgánicos y la obtención de un esquema de purificación de peptidasas presentes en él.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Material vegetal**

Se emplearon frutos de *Bromelia serra* colectados por la Lic. Graciela Klekailo en el Campo Experimental Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (mayo de 2017). Los frutos fueron separados de sus infrutescencias, lavados con agua corriente para retirar suciedad y gomas, enjuagados con agua destilada, secados al aire, envasados herméticamente y almacenados a -20°C.

### **2. Obtención de extractos crudos**

Los frutos fueron cortados en pequeños trozos y triturados en una procesadora durante 1 min, en intervalos de 10 s con igual tiempo de espera, en presencia de buffer fosfato 0,1 M de pH 6,0 (EC 1) o buffer cítrico-fosfato 0,1-0,2 M de pH 5 (EC 2), ambos con EDTA y cisteína 5 mM como agentes protectores. Esta preparación fue filtrada con un colador y tela sintética para eliminar materiales insolubles, y posteriormente centrifugada (30 min, 4°C, 10.000 rpm). La suspensión sobrenadante fue denominada extracto crudo (EC), fraccionada y almacenada a -20°C.

### **3. Purificación preliminar**

El EC 2 fue precipitado con distintos volúmenes de acetona y etanol (entre 2 y 8). La operación se llevó a cabo a -20 °C durante 30 min, luego se centrifugó a

10000 rpm, se eliminaron los restos de solvente con una bomba de vacío y se resuspendió cada precipitado en un volumen igual al de partida con el buffer de extracción.

### **4. Determinación del contenido de proteínas**

Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford (1976) empleando una curva de calibración de albúmina bovina (100-1000 µg/ml) tanto al EC, como a cada uno de los precipitados etanólicos (PER) y acetónicos (PAR) redisueltos.

### **5. Actividad proteolítica sobre caseína**

Se determinó la actividad caseinolítica (López *et al.*, 2000) al EC deteniendo la reacción a diferentes tiempos para establecer un rango lineal de trabajo y se seleccionó un tiempo final adecuado para posteriores determinaciones (20 min). Luego se realizó el mismo ensayo a los PER y los PAR deteniendo la hidrólisis a los 20 min.

### **6. Determinación del tipo catalítico**

Con el objeto de determinar el tipo catalítico de las proteasa en estudio se realizó el ensayo de actividad caseinolítica utilizando como muestras, alícuotas del EC 2 preincubadas 30 min a 37 °C con inhibidores de grupo catalítico en diferentes concentraciones: ácido iodoacético (AIA, 1 y 10 mM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 1 mM, en

presencia y ausencia de cisteína 12mM, y 10 mM), ácido etilendiaminotetraacético, (EDTA, 1 y 10 mM) y pepstatina A (0,1 y 1 mM).

### **7. Activación con cisteína**

Se llevó a cabo la determinación de actividad caseinolítica del EC 2 en presencia de diferentes concentraciones de cisteína (5 a 50 mM), la cual fue adicionada a la caseína empleada como sustrato.

### **8. Inactivación térmica**

Se determinó el tiempo de inactivación del EC 2 por shock térmico ensayando la actividad caseinolítica luego de preincubar la muestra a 100 °C durante diferentes tiempos (2 a 20 min). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al valor obtenido del ensayo realizado con la muestra sin preincubar a diferentes temperaturas.

### **9. Actividad en presencia de cloruro de sodio**

Se determinó la actividad residual del EC 2 ensayando la actividad caseinolítica en presencia de concentraciones crecientes de cloruro de sodio (1 a 4 M). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al valor obtenido para la muestra sin agregado de sal.

### **10. Determinación de la curva de pH óptimo**

Se obtuvo la curva de pH óptimo determinando actividad sobre caseína

preparada en buffer de Good (1972) abarcando un rango de pH de 6 a 12. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al mayor valor obtenido.

### **11. Estabilidad a diferentes temperaturas**

Se llevó a cabo la determinación de actividad caseinolítica del EC preincubando el mismo a diferentes temperaturas (23 a 75 °C) durante diferentes tiempos (10 a 120 min). Se graficaron curvas de estabilidad a la temperatura tomando en cada caso como valor de referencia (100 % de actividad) al valor obtenido por las muestras sin preincubar (valor inicial de actividad).

### **12. SDS-PAGE del EC**

Fue realizada en un equipo Miniprotean III (Bio-Rad) de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). Durante el desarrollo de la misma, la corriente se mantuvo constante a 40 mA durante el apilamiento ("stacking") y luego se llevó a 60 mA durante 40 min. Los geles (poliacrilamida al 12,5 %) fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue G-250. Los valores de las masas moleculares fueron determinados por comparación con patrones proteicos.

### **13. Isoelectroenfoco (IEF) – Zimograma**

El IEF del EC se llevó a cabo en una Mini IEF Cell, Mod. 111 (Bio-Rad). La muestra fue precipitada con acetona y el precipitado fue redisolto con agua bidestilada. Se usaron geles de

poliacrilamida al 5% con anfolitos de amplio rango (Pharmalyte 3-10, Pharmacia). Los geles fueron fijados y coloreados con Coomassie Brilliant Blue R-250. Los zimogramas se realizaron incubando los geles de IEF sobre un gel de agarosa embebido en caseína durante 15 min a 55 °C y revelados por coloración con Coomassie Brilliant Blue R-250.

#### **14. Esquema de purificación cromatográfica**

Las muestras de EC fueron acondicionadas para ser purificadas por cromatografía de intercambio iónico por ultrafiltración con tubos Millipore de 3 kDa o por cromatografía de exclusión molecular. En este último caso se emplearon columnas empacadas con 35 ml de Sephadex G-25 y columnas de 5ml Hi-Trap Desalting (Sephadex G-25 Superfine), eluyendo con 2 volúmenes de columna con buffer cítrico-fosfato 0.01 M pH 5.0 y buffer citrato 0.02 M pH 5.0, respectivamente. Se practicaron numerosas cromatografías de intercambio catiónico (columna Hi-Trap SP-HP, GE) y aniónico (columna Hi-Trap Q-HP, GE) dependiendo del pI de la peptidasa a purificar. Se verificó cualitativamente la presencia de actividad en los picos principales eluidos, sobre gelatina de placas fotográficas reveladas, no expuestas a la luz, en las cuales se colocaron 20 µl de muestra y controles

positivos (EC) y negativos (albúmina) de proteólisis, incubadas 30 min a 55°C. Todas las corridas se llevaron a cabo en un equipo ÄKTA Purifier, General Electric.

#### **15. Análisis de los datos.**

Los valores de las diferentes determinaciones fueron obtenidos por triplicado y/o cuadruplicado de 1 ó 2 determinaciones según el caso y se expresaron como el promedio  $\pm$  el desvío standard (DS). Para determinar la presencia de diferencias significativas entre grupos de datos con distinto tratamiento experimental se utilizaron test de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, analizando la significancia de los pares de datos con el test de Dunnet o el de Tukey según el caso ( $p < 0,05$ ) empleando el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA 92037 USA).

### **Resultados y Discusión**

#### **1. Caracterización enzimática ECs**

Se obtuvieron dos extractos crudos, para los cuales se muestran en la tabla 1 los valores correspondientes a su concentración proteica y actividad enzimática.

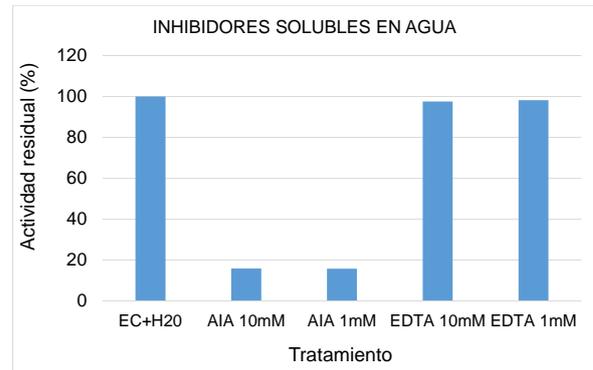
	Proteínas µg/ml	Actividad (Ucas/ml)	Actividad Específica (Ucas/mg)
<b>EC1</b>	321±18	0,3±0,2	0,9±0,6
<b>EC2</b>	346±39	1,6±0,1	4,5±0,6

**Tabla 1.** Concentración y actividad enzimática de los ECs.

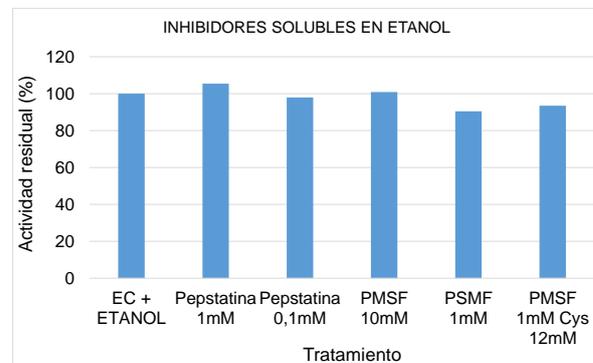
El EC2 presentó la mayor actividad específica y por lo tanto fue seleccionado especialmente como punto de partida en etapas de purificación de las peptidasas.

## 2. Determinación del tipo catalítico

De los 4 inhibidores de grupo catalítico con los que se ensayó la actividad caseinolítica del EC2, se detectó una diferencia significativa respecto del control sin inhibidor ( $P < 0,05$ ; test de Tukey) sólo para el tratamiento llevado a cabo en presencia de ácido iodoacético (inhibidor de proteasas cisteínicas), recuperándose un 15 % de actividad residual (Figuras 1a y 1b). Para el resto de los inhibidores se mantiene una actividad de alrededor del 100 % respecto del control ( $P > 0,05$ , test de Tukey). Estos resultados corroboran que el EC2 posee proteasas de tipo cisteínico como es de esperarse para peptidasas de especies vegetales de la familia Bromeliaceae (Pardo *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2008; López-García *et al.*, 2012).



**Figura 1.a.** Actividad residual del EC 2 pre-incubado con inhibidores de grupo catalítico solubles en agua.

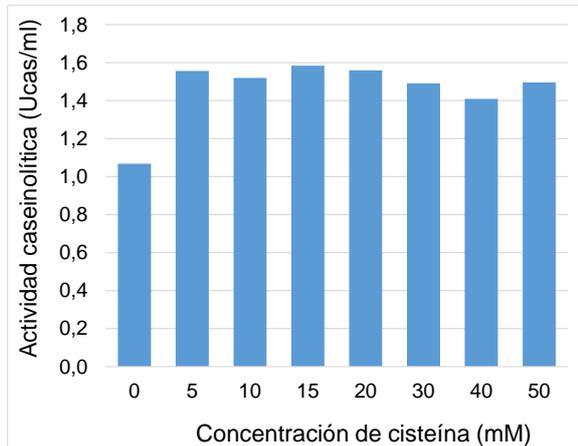


**Figura 1.b.** Actividad residual del EC 2 pre-incubado con inhibidores de grupo catalítico solubles en agua.

## 3. Activación con Cisteína

Al realizar el ensayo de actividad caseinolítica con el agregado de cisteína se obtuvo que la concentración 5 mM es suficiente para mejorar la catálisis en un 45,7% respecto del control (diferencia de 0,5 Ucas) y se mantiene cuando se aumenta la concentración de este aminoácido, como se muestra en la figura 2. Este valor es tres veces menor a la concentración crítica de cisteína determinada para las proteasas de *B. hieronymi* (Bruno *et al.*, 2003). Los valores

obtenidos a mayores concentraciones no presentaron diferencias significativas con respecto a la determinación con 5 mM de cisteína ( $P > 0,05$ ).



**Figura 2.** Activación con cisteína del sitio catalítico de las proteasas presentes en el EC2.

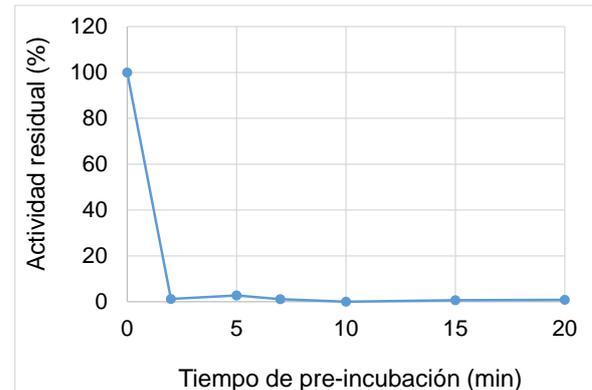
#### 4. Inactivación por shock térmico

Con objetivo de conocer el tiempo mínimo necesario para inactivar las enzimas presentes en el EC2, se lo pre-incubó a 100°C obteniendo como resultado que a los 2 minutos se pierde el 99% de actividad como se observa en la figura 3. Esta información resultaría de utilidad en el caso de emplear estas enzimas en procesos industriales, como por ejemplo, en la obtención de hidrolizados de proteínas alimentarias, ya que significaría un bajo costo el proceso de inactivación de las mismas.

#### 5. Fuerza iónica

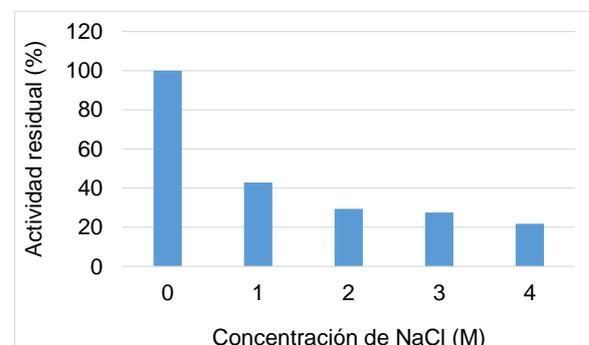
Al ensayar actividad enzimática sobre caseína con el agregado de

concentraciones crecientes de cloruro de sodio, se obtuvo que en solución 1M se mantiene un 43 % de actividad respecto del control sin el agregado de dicha sal.



**Figura 3.** Actividad residual del EC2 pre-incubado a 100°C.

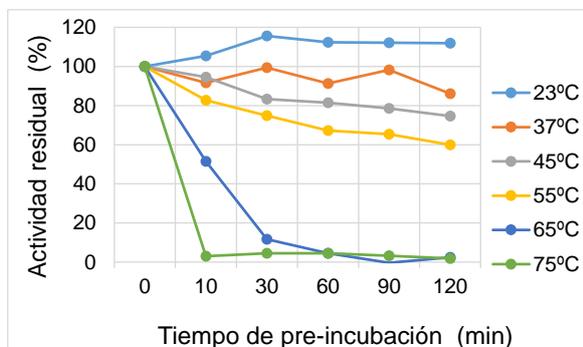
Como se muestra en la figura 4, para la máxima concentración de NaCl se recuperó un 22 % de actividad. Esta información puede resultar de interés si se empleara el EC en la industria alimentaria, por ejemplo en la manufactura de quesos, ya que si las peptidasas permanecen muy activas durante el almacenamiento del producto, podrían degradar la matriz caseínica del queso.



**Figura 4.** Actividad caseinolítica del EC2 en presencia de distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl).

## 6. Estabilidad térmica

Se testeó la actividad caseinolítica sobre el EC2 pre-incubado por diferentes lapsos de tiempo y a diferentes temperaturas. La figura 5 muestra que el EC2 es estable a 23 y 37°C durante los 120 minutos que fue testeado. Los datos fueron analizados mediante el test de Dunnet y los resultados arrojados confirman que no hay diferencias significativas con el tiempo 0 en el tratamiento a 37°C ( $P > 0,05$ ). A 45°C no hay diferencias significativas con el tratamiento a 10 minutos pero sí con el resto ( $P < 0,05$ ). Por sobre los 65°C la actividad enzimática del extracto cae abruptamente a los 10 min.

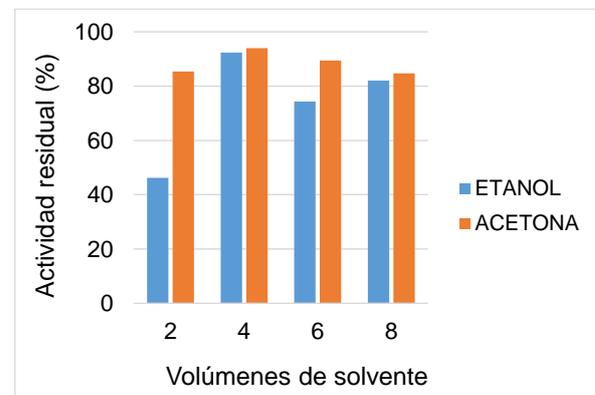


**Figura 5.** Comparación de la actividad caseinolítica del EC2 pre-incubado a diferentes temperaturas por diferentes períodos de tiempo.

## 7. Purificación parcial con solventes orgánicos

Para ambos tratamientos (acetona y etanol), con cuatro volúmenes de solvente se recuperó por encima del 90% de actividad respecto del extracto crudo (EC2). En la figura 6 se observa la

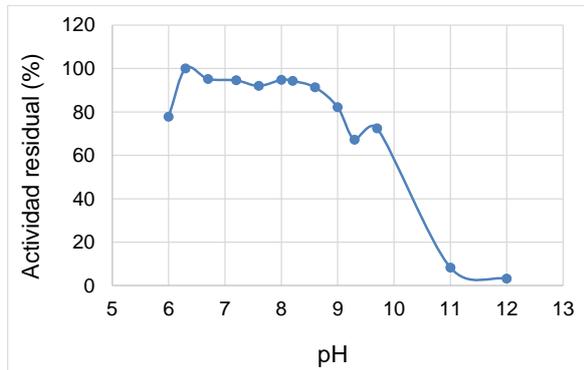
comparación entre los diferentes volúmenes de solvente utilizados para cada tratamiento.



**Figura 6.** Comparación de la purificación parcial del EC2 con diferentes volúmenes de acetona y etanol.

## 8. Determinación del pH óptimo de reacción

En las condiciones de reacción enzimática en las que se ensayó el EC1, se obtuvo que dicho extracto presentó una actividad enzimática superior al 95% en el rango de pH entre 6,2 y 6,7, respecto del valor máximo exhibido a pH 6,3. Estos resultados posibilitaron seleccionar el pH a la que se realizaron las posteriores medidas de actividad caseinolítica sobre el EC2. En la figura 7 se muestra el perfil de pH del EC. Este rango de pH resultó ser más ácido que el obtenido para las peptidasas de *B. hieronymi*, cuya actividad es máxima a valores de pH mayores a 8.



**Figura 7.** Perfil de pH del EC1 ensayado sobre caseína en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5 a 45°C.

### 9. Caracterización del perfil proteico

Mediante IEF se identificaron 4 bandas proteicas principales, de las cuales la mayoritaria (pI 6,2) no presentó actividad proteolítica al zimograma, mientras que las bandas de pI 7,6, 7,0 y 3,6 presentaron actividad. Por otra parte, por análisis de la SDS-PAGE se observó la presencia de la típica banda correspondiente a peptidasas cisteínicas vegetales entre 23 y 25 kDa (Grudkowska, M. y Zagdanska, B., 2004).

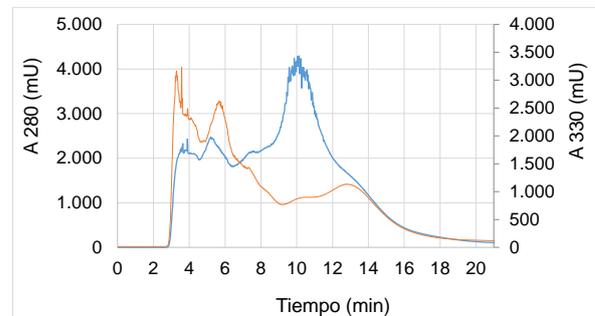
De acuerdo a estos resultados se planteó como esquema de purificación la realización de cromatografías de exclusión molecular para separar las peptidasas de otros componentes presentes en la muestra (pigmentos) de peso molecular muy diferente, y la purificación por cromatografía de intercambio catiónico y aniónico de las peptidasas de pI básico (7,6 y 7,0) y ácido (pI 3,6), respectivamente.

### 10. Purificación cromatográfica

Se realizaron repetidas corridas cromatográficas de intercambio iónico y de exclusión molecular las cuales arrojaron resultados preliminares para continuar con el esquema de purificación.

La cromatografía de exclusión molecular (figura 8) muestra la separación de dos grandes fracciones de las cuales la mayoritaria (8-14 min de elución) no posee actividad proteolítica sobre gelatina (placa fotográfica revelada, no expuesta a la luz).

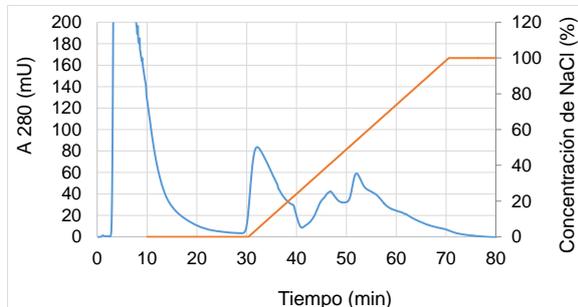
Este resultado ofrece un punto de partida para la elección de la fracción del EC2 óptima para continuar con la purificación mediante columnas de intercambio iónico.



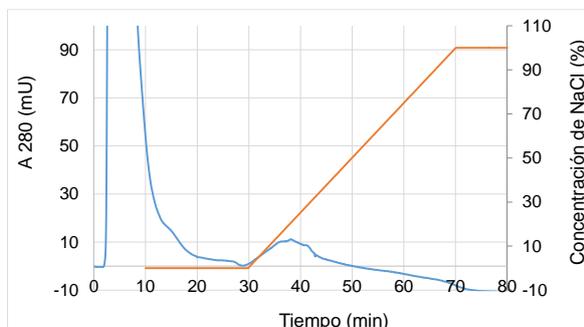
**Figura 8.** Cromatograma 1: columna de exclusión molecular. Línea naranja: A<sub>330</sub> nm; línea azul: A<sub>280</sub> nm

Con la columna de intercambio aniónico se lograron identificar tres picos principales (figura 9a), mientras que con la columna de intercambio catiónico (figura 9b) se observó la separación de un único pico en sus respectivos cromatogramas. En ambos casos la muestra

cromatografiada fue la fracción del EC 2 menor a 3 KDa.



**Figura 9a.** Cromatograma 2: columna de intercambio aniónico. Línea azul: A<sub>280</sub> nm; línea naranja: gradiente salino.



**Figura 9b.** Cromatograma 3: columna de intercambio catiónico. Línea azul: A<sub>280</sub> nm; línea naranja: gradiente salino.

## Conclusiones

Se obtuvieron dos diferentes extractos con actividad proteolítica a partir de frutos de *B. serra*, una especie comestible, nativa de la región del Chaco Semiárido de Argentina, y que es cultivada con fines experimentales. Las peptidasas cisteínicas de estos extractos exhibieron características definidas, que resultan promisorias para su empleo en procesos industriales. Un esquema preliminar de purificación cromatográfica ha sido presentado, requiriendo futuros ajustes

que permitan la obtención de fracciones puras para ser estudiadas desde el punto de vista cinético y estructural. El conocimiento de estas enzimas posibilitaría su elección de manera específica para determinadas aplicaciones en la industria alimentaria, especialmente la utilización del PER, ya que se ha demostrado que recupera un porcentaje muy alto de actividad proteolítica y como característica adicional, los posibles residuos etanólicos generados durante su procesamiento a gran escala, resultarían inocuos a la salud humana, en contraste con otros solventes que se utilizan frecuentemente para este tipo de purificaciones.

## Bibliografía

- Abdul Muhammad, Z., y Ahmad, T. (2017). Therapeutic uses of pineapple-extracted bromelain in surgical care-A review. *JPMA: Journal of the Pakistan Medical Association*, 67, 121-125.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., y Woessner J.F. (2004). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. London, England: Elsevier.
- Bradford, M.B. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the

- principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.
- Bruno, M. A., Pardo, M. F., Caffini, N. O., y López, L. M. (2003). Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Journal of protein chemistry*, 22(2), 127-134.
- Bruno, M. A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., y López, L. M. (2008). Purification and characterization of hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *The protein journal*, 27(7-8), 426-433.
- Bruno, M. A., Lazza, C. M., Errasti, M. E., López, L. M., Caffini, N. O., y Pardo, M. F. (2010). Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 695-701.
- Caffini, N. O., Natalucci, C. L., Priolo, N. S., y Buttazzoni, M. S. (1988). Proteasas de Bromeliaceae IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrónica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb. *Acta Farm. Bonaerense*, 7(1), 9-14.
- Dickinson, D. P. (2002). Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(3), 238-275.
- Feijoo-Siota, L., y Villa, T. G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1066-1088.
- Good, N. E., e Izawa, S. (1972). Hydrogen ion buffers. *Methods in enzymology*, 24, 53-68. Academic Press.
- Grudkowska, M., y Zagdanska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3), 609-624.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., e Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS letters*, 587(8), 1155-1163.
- López, L. M., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D., y Caffini, N. O. (2000). Purification and characterization of macrodontan I, a cysteine peptidase from unripe fruits of

- Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expression and purification*, 18(2), 133-140.
- López-García, B., Hernández, M., y Segundo, B. S. (2012). Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens. *Letters in applied microbiology*, 55(1), 62-67.
- Maurer, H. R. (2001). Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(9), 1234-1245.
- Owoyale, B. V., Adebukola, O. M., Funmilayo, A. A., y Soladoye, A. O. (2008). Anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Carica papaya* leaves. *Inflammopharmacology*, 16(4), 168-173.
- Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., y Luis, A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 521-530.
- Pardo, M. F., López, L. M., Canals, F., Avilés, F. X., Natalucci, C. L., y Caffini, N. O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), 3795-3800.

### Agradecimientos

Se agradece especialmente a la Lic. Graciela Klekailo de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario por realizar la recolección y envío del material vegetal empleado en el presente trabajo. La Lic. Lucía Salese es becaria doctoral de CONICET; la Dra Mariela A. Bruno es investigadora adjunta de CONICET.

### Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos: PICT-2013-2531 de la ANPCyT; Proyectos X-746 y X-682 de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.