

DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEASAS OBTENIDAS DEL FRUTO *Thevetia ahouai* (L.) A.DC

Determination and Partial Characterization of Proteases Isolated of Fruit *Thevetia Ahouai* (L.) A.DC

HECTOR GRATEROL¹, LUIS AMAÍZ, ESTHER TORQUATI y LELLYS COTRERAS
Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias y Tecnología. Departamento de Biología.
Carabobo. Venezuela.

¹godofredo9_5@hotmail.com, {leamaiz, etorquat, contrera}@uc.edu.ve

Fecha de Recepción: 15/02/2007, **Fecha de Revisión:** 25/09/2007, **Fecha de Aceptación:** 30/10/2007

Resumen

Se caracterizó la actividad proteolítica de tipo gelatinasa presente en el fruto de *Thevetia ahouai* (L.) A.DC. por zimografía empleando gelatina como sustrato al 0.2% en SDS-PAGE al 12%. Se determinó el patrón de bandas electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, detectándose la presencia de ocho bandas de 75, 59, 50, 35, 32, 30, 15 y 10 kDa, donde se estimó un peso molecular de 75 kDa para la proteasa detectada. Se observó susceptibilidad al Fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) confirmando la presencia de un sitio activo similar a las proteasas del tipo serina. La actividad también se determinó de manera cualitativa en placas de agar con hemoglobina Bovina al 1% p/v, evidenciándose la presencia de halos de hidrólisis. Finalmente se estudiaron algunas propiedades tales como la dependencia de la actividad en relación al pH, con un valor óptimo de 8 y una temperatura óptima de 55°C.

Palabras claves: Biotecnología, Proteasas, *Thevetia Ahouai* (L.) A.DC.

Abstract

A proteolytic gelatinase activity present in the *Thevetia ahoui's* (L.) A.DC fruit was characterized using zymographic methods, in gels using gelatin as substrate (0.2 %) in SDS-PAGE (12%). The electrophoretic pattern was determined by SDS-PAGE 12%, and it conformed by eight bands with 75, 59, 50, 35, 32, 30, 15 y 10 kDa. The molecular weight of the proteolytic activity was determined in a band with 75 kDa. The sensibility to Phenyl – Methyl – Sulphonil - Fluoride confirmed an active site similar to the serin proteases type. The qualitative detection of the activity was carried out in agar plates with bovine hemoglobin (1% w/V) demonstrating a hydrolytic clear shade. Finally biochemical properties like optimum pH and optimum temperature were studied with 9 for pH and 55 ° C for temperature.

Key words: Biotechnology, Proteases, *Thevetia Ahouai* (L) A.DC.

1. Introducción

El empleo de enzimas en los procesos industriales, se ha venido incrementando durante los últimos años, gracias al desarrollo de la biotecnología. Sin embargo, las altas temperaturas de los procesos industriales y la termolabilidad de la mayor parte de las enzimas empleadas y actualmente conocidas, son los principales obstáculos en la utilización de determinadas proteínas dentro del ámbito industrial, estimulándose así la investigación en lo concerniente a la búsqueda de fuentes alternas para la obtención de enzimas termoestables.

La obtención de proteasas termoestables (la mayoría obtenidas a partir de organismos termófilos) ofrece múltiples usos en la industria, ya que hidrolizan una variedad importante de sustratos resistentes a las altas temperaturas. Estas pueden ser empleadas en la producción de nuevos péptidos, entre los cuales destacan como aditivos en la formulación de detergentes. Adicionalmente, las proteasas termoestables son capaces de resistir la desnaturalización por solventes orgánicos, de manera que pueden ser empleadas en la síntesis orgánica de proteínas (Babé & Schindt, 1998).

Asimismo el interés creciente por los tóxicos naturales, ha cobrado fuerza en la actualidad y constituye uno de los aspectos relevantes de la fármaco-toxicología moderna. Existen plantas que al ser ingeridas de manera directa por los animales o el hombre pueden comprometer seriamente la salud, presentándose cuadros clínicos de intoxicaciones agudas, subcrónicas y crónicas debidas a la presencia de toxinas de origen proteico (Flores *et al.*, 2001). La familia *Apocinaceae* comprende aproximadamente unos 250 géneros y 2000 especies que se distribuyen predominantemente en las regiones

tropicales y subtropicales de todo el mundo (Cronquist, 1981). Dentro de estos, los géneros *Acokanthera*, *Nerium*, *Ochrosia*, *Plumeria*, *Rauvolfia*, *Thevetia* y *Himatanthus* representan la mayoría de las especies (Cronquist, 1981; Lentz, 1993).

Ha sido reportado en la literatura el aislamiento de alcaloides de importancia farmacológica, de plantas de pertenecientes a la familia *Apocinaceae*, por ejemplo de las especies de los géneros *Rauvolfia* y *Tabernaemontana* (ambas pertenecientes a la sub-familia *Plumeroideae*). Esta familia de plantas representa una fuente de fármacos y enzimas responsables de la inusual resistencia al ataque de artrópodos y toxicidad al ser consumidos por animales (Flores *et al.*, 2001) que una vez estudiados a fondo pueden ser empleados en la lucha contra enfermedades tales como el cáncer. Ejemplos clásicos son los llamados vinca alcaloides (vinblastina y vinicristina) aislados de la planta africana originaria de la isla de Madagascar *Catharanthus roseus* (*Apocinaceae*)(Cronquist, 1981).

1.1 Clasificación de las proteasas

Las proteasas se clasifican en función de tres criterios: tipo de reacción catalizada, naturaleza química del sitio catalítico y relación evolutiva con referencia a su estructura (Barett, 1995). Las proteasas dependiendo de su sitio de acción comúnmente se subdividen en dos grupos: exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas rompen el enlace peptídico terminal del sustrato mientras que las endopeptidasas rompen los enlaces peptídico distantes del extremo del sustrato. Basado en el grupo funcional presente en el sitio activo, las endopeptidasas se clasifican en 4 grupos: serinaproteasas, proteasas del aspartico, cisteínaproteasas y metaloproteasas (Hartley, 1960; Beynor & Bond, 1994). Las serina proteasas se caracterizan por la presencia de

un residuo de serina en su sitio activo, presentando una triada catalítica de tres aminoácidos: serina (nucleófilo), aspartato (electrófilo) e histidina (base). Las serina proteasas son reconocidas por su inhibición irreversible con 3,4 dicloroisocumarina (3,4-DCI), 4-guanidina, diisopropilfluorilfosfato (DFP), fenil-metil-sufonil-fluoruro (PMSF) y Tiosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) (Brenner, 1988). Las proteasas alcalinas que son activas a altos valores de pH representan un amplio grupo de las serinaproteasas. Las metaloproteasas poseen una mayor diversidad catalítica pero tienen en común el requerimiento de un ión divalente para su actividad, dentro de este grupo se incluyen enzimas de gran variedad tales como las colagenasas de organismos superiores, toxinas hemorrágicas y termolisinas bacterianas. Todas son inhibidas por agentes quelantes de iones metálicos tales como el EDTA, pero no por agentes sulfidrilos o DFP. (Labbe *et al.*, 1974) Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que los homogenatos del fruto *Thevetia ahouai* poseen enzimas con actividad proteolítica (Graterol *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta la evidencia anterior, se ha planteado la caracterización bioquímica y posterior purificación etapas previas necesarias para proponer estas enzimas como insumos para la industria regional y nacional.

Existe numerosa bibliografía acerca del aislamiento y caracterización de alcaloides a partir de *Thevetia ahouai* y sus relacionados, pero es poca o inexistente la bibliografía acerca de las propiedades biológicas de esta planta. En (Cronquist, 1981) se demostró que el látex de *Thevetia ahouai* contenía un conjunto de compuestos tóxicos incluyendo glicosidos cardíacos y alcaloides. (Lentz, 1993) reportó el empleo medicinal del látex de *Thevetia ahouai* por los indios de la etnia Paya en Honduras como anestésico local para dolores dentales, antiinflamatorio y

como elemento de tratamiento para la miiasis. (Endo *et al.*, 1997), estudiaron los glicosidos cardenólicos de *Thevetia ahouai* (L.) A.DC. y demostraron la presencia de 20 glucósidos cardenólicos entre ellos 4 nuevas combinaciones de aglicoles y azúcares. (Flores *et al.*, 2001) colocó a *Thevetia ahouai* entre las plantas de la flora yucatanense que provocan alguna toxicidad en el humano, al reportar casos en los cuales, la ingestión de alguna de las partes de la planta causó trastornos del sistema nervioso y corazón, pudiendo causar la muerte. (Graterol *et al.*, 2005) reportó la detección y caracterización de actividades hidrolíticas en extractos salinos de *Thevetia ahouai* con la detección de una actividad proteolítica tipo gelatinasa en zimogramas copolimerizados con gelatina

Es por ello que el siguiente trabajo de investigación tuvo como objetivo *la determinación y caracterización parcial de la actividad proteasas/gelatinasas obtenidas del fruto de Thevetia ahouai* (L.) A.DC. Entre los objetivos específicos se encuentran:

- Determinar la actividad de proteasa/gelatinasa en homogenatos del fruto de *Thevetia ahouai*, en placas de hemoglobina y gelatina al 1%
- Determinar la actividad de proteasa/gelatinasa en zimogramas copolimerizados con gelatina.
- Caracterizar el perfil electroforético de las diferentes proteínas presentes en el homogenato salino de *Thevetia ahouai*.
- Determinar la temperatura y pH óptimo de la actividad de proteasa detectada.

- Determinar el efecto de la temperatura en la termoestabilidad enzimática.
- Determinar el efecto de los inhibidores clásicos de proteasas sobre la actividad de proteasa/gelatinasa detectada.

2. Materiales y Métodos

2.1 Obtención del extracto a partir del fruto de *Thevetia ahouai*

Se colectaron frutos maduros de *Thevetia ahouai*, se les retiró el exocarpo y se procedió a homogenizar en con una solución de NaCl al 1% en una proporción 1:2 p/v. Se filtró este extracto dos veces empleando gasa y posteriormente se centrifugó para extraer el almidón. Este extracto crudo fue posteriormente congelado en nitrógeno líquido y liofilizado a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 133×10^{-3} mBar para ser posteriormente resuspendido en un volumen de agua destilada Este fue el extracto partir del cual se realizaron todos los ensayos (Graterol *et al.*, 2005).

2.2 Detección de la actividad proteolítica con hemoglobina y gelatina.

La actividad proteolítica se determinó cualitativamente usando placas de agar con hemoglobina al 1% (p/v). Se realizaron agujeros sobre la superficie de la placa en condiciones de esterilidad y se aplicaron cantidades crecientes de extracto (0 μg , 250 μg , 500 μg y 1000 μg de proteínas respectivamente). Posteriormente estas placas fueron incubadas en una estufa a 55°C por 24 y 48 horas, tiempo después del cual fueron visualizadas con ayuda de un transiluminador para ser registradas fotográficamente. Procedimiento semejante se realizó en las placas con gelatina

preparadas al 0,5% (p/v) pero una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar una tinción con el colorante Azul de Coomassie R-250 según el método descrito por (Vermelho *et al.*, 1995).

2.3 Electroforesis

La determinación de la masa molecular de la enzima detectada se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 12% (SDS-PAGE), bajo condiciones nativas y desnaturalizantes. Se empleó un marcador de peso molecular con pesos moleculares de 10 kDa a 225 kDa (Sigma). La muestra fue corrida a 120 V a temperatura ambiental e inmediatamente fue teñido con una tinción combinada plata-Coomassie Brilliant Blue R-250 (Laemmli, 1970; Stoll *et al.*, 1976).

2.4 Determinación de la actividad proteolítica en zimogramas

Para la determinación de la actividad enzimática se realizaron zimogramas copolimerizados con gelatina al 0,2% (p/V) en un gel de poliacrilamida al 12 %. Las corridas se llevaron a cabo a 120 V a 4°C y se incubaron en un tampón Glicina-NaOH 0,1 M pH 9,0 en una estufa por 12 h a 55°C . Las corridas zimograficas fueron realizadas de manera simultánea con las corridas electroforéticas. Para indicar las zonas enzimáticas activas, se les añadió colorante de Coomassie Brilliant Blue G-250 y las bandas blancas del gel se cuantificaron utilizando densitometría ImageJ. Las bandas del gel electroforético se cuantificaron utilizando densitometría. Para el análisis densitométrico los geles de zimografía y electroforesis y se empleó el programa PhotoShop para aumentar el contraste y facilitar los cálculos (Amaíz, 2003).

2.5 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad proteolítica de la enzima por zimografía

La actividad enzimática se evaluó a distintas temperaturas (4 a 75° C). Posteriormente a la corrida se cortaron varias tiras del gel y se incubaron a las temperaturas deseadas. Las bandas fueron cuantificadas por el software ImagenJ. Para los distintos valores de pH (4,0 a 11,0) se emplearon tampones acetato/acetico (pH 4 y 5), fosfato (pH 6), Tris-HCl (pH 7 y 8), Glicina/NaOH (9, 10). Los geles fueron incubados a la temperatura óptima de actividad (55° C) por 12 horas. Las bandas con actividad proteolítica serán cuantificadas por densitometría Imagen J (Labbe *et al*, 1974; Li & Yousten, 1975; Medina, 2000).

2.6 Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica por zimografía

Esta fase experimental se realizó utilizando etilendiamintetraacético (EDTA), y Fenil-metil-sulfonil-Fluoruro (PMSF) como inhibidores en una concentración de 10 mM respectivamente. El inhibidor PMSF se preparó con etanol, y el volumen añadido no excedió el 2% del volumen final de incubación. (Morihana, 1974). Las muestras se incubaron con los respectivos inhibidores a 25 ° C por 30 min y luego fueron inyectados en los carriles de los zimogramas. Estos zimogramas fueron incubados a pH 9 por 12 horas a 55° C. Las actividades fueron cuantificadas por densitometría Imagen J (Amaíz, 2003).

2.7 Termoestabilidad de las proteasas

Para evaluar la termoestabilidad de la enzima se incubaron por una hora los extractos obtenidos sin tampón de muestra a temperaturas comprendidas entre los 4 y 75 °C. Posteriormente se les agregó el tampón

muestra y se cargaron en un gel de electroforesis copolimerizado con gelatina. Las bandas resultantes fueron digitalizadas y cuantificadas mediante el software ImagenJ.

2.8 Cuantificación de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas se empleó el método propuesto por Bradford (Bradford, 1976). Se realizaron curvas de calibración empleando Albúmina sérica bovina (BSA) en intervalos de 10 µg hasta 100µg para realizar su lectura a una longitud de onda de 595 nm.

3. Resultados y discusión

3.1 Detección de la actividad proteolítica con hemoglobina y gelatina

Con la finalidad de confirmar que los extractos salinos obtenidos de *Thevetia ahouai* eran capaces de degradar proteínas, se inocularon en placas suplementadas con hemoglobina bovina, los resultados obtenidos a las 24 horas de incubación se muestran en la Fig. 1. Transcurrido el tiempo de incubación de 24 horas las placas de hemoglobina presentaron halos claros en los alrededores de los agujeros en los cuales se colocaron concentraciones crecientes del extracto. Se notó así mismo un aumento del diámetro en cada uno de los agujeros en función de las concentración de la misma, de esta manera concentraciones mayores del extracto mostraron los mayores diámetros en sus halos de hidrólisis. La coloración clara de estos halos se debe a la acción proteolítica de la enzima que al degradar las cadenas de amino ácidos que forman la estructura globular de la hemoglobina que promueve la liberación del grupo hemo teniendo como consecuencia la decoloración observada, siendo de color pardo los productos de esta reacción. Es importante igualmente señalar que el diámetro del halo de hidrólisis

experimentó un ensanchamiento a las 48 horas (Resultado no mostrados)

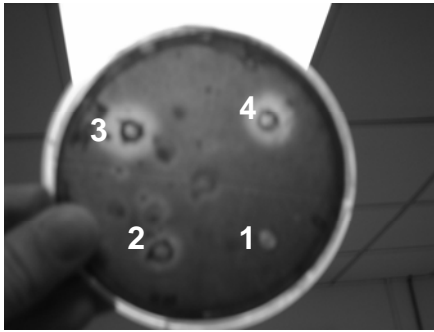


Fig. 1. Actividad proteolítica en placas con hemoglobina. 1: 0 μg , 2: 250 μg , 3: 500 μg , 4: 1000 μg de proteínas

Resultados similares se obtuvieron en las placas suplementadas con gelatina (Fig. 2). La gelatina es una proteína compleja no existiendo como componente en los animales, obteniéndose por la hidrólisis parcial del colágeno, su precursor insoluble. En el colágeno, la unidad básica esta formada por tres cadenas de polipéptidos, enrolladas en forma de hélice y estabilizadas por uniones intramoleculares.

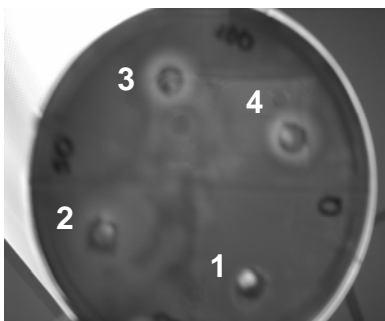


Fig. 2. Actividad proteolítica en placas con gelatina. 1: 0 μg , 2: 250 μg , 3: 500 μg , 4: 1000 μg de proteínas.

La actividad proteolítica se evidenció por la presencia de halos claros de hidrólisis producto de la débil unión del colorante Azul de Coomassie R-250, colorante orgánico que en medio ácido se une a las proteínas mediante interacciones

electrostáticas con los grupos amino. Igualmente se realizó un ensayo preliminar en un zimograma que luego de 12 horas de incubación y luego de ser teñido presentó las áreas claras de hidrólisis proteica (Fig. 3).

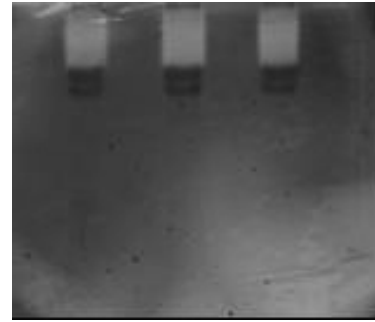


Fig. 3. Zimografía en gels de poliacrilamida copolimerizados con gelatina al 0,2 %.

3.2 Determinación del peso molecular mediante electroforesis en gels de poliacrilamida en condiciones nativas y desnaturalizantes

Con la finalidad de determinar el peso molecular de la proteasa se realizaron electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes para luego al ser superpuestos con lo zimogramas correspondientes estimar el peso molecular de la enzima. El patrón de bandas electroforético en condiciones nativas estuvo mayoritariamente dominado por ocho bandas de 75, 59, 50, 35, 32, 30, 15 y 10 kDa. Los resultados obtenidos muestran que la proteasa se trata de una banda simple de 75 kDa (Fig. 4). Se ha encontrado que la proteasa detectada posee un peso molecular superior a otras proteasas producidas en este caso por bacterias específicamente del género *Bacillus*. Pues es posible encontrar que *Bacillus*. B18' excreta una proteasa del tipo similar de 30 kD, la bacteria alcalofila *Bacillus licheniformis* secreta una serina proteasa con un peso molecular de 26 kD y mas recientemente la bacteria *Bacillus sphaericus* que secreta dos proteasas con

pesos de 28.7 y 68 kD respectivamente, siendo la enzima de mayor peso molecular una enzima constituida por dos sub-unidades pequeñas.

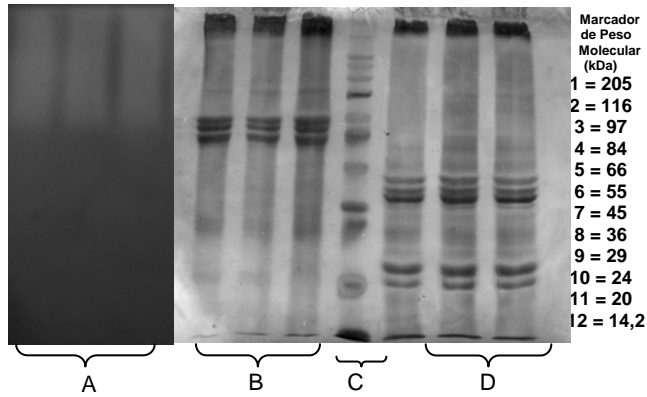


Fig. 4. Determinación del peso molecular de la proteasa A. Corrida zimográfica, B. electroforesis en condiciones nativas, C. Marcador de peso molecular, D. Electroforesis en condiciones nativas

En la bibliografía también se encuentran enzimas con pesos moleculares muy similares a los de la enzima detectada como es la producida por *Alcaligenes faecalis* cuyo peso molecular es de 67 kD y que como se verá posteriormente posee características similares a la proteasa detectada en cuanto a sus valores de temperatura y pH óptimo.

3.3 Efecto de inhibidores clásicos sobre la actividad proteolítica

Los resultados se muestran en la Fig. 5, obteniéndose la inhibición de casi un 100% de la actividad por la acción de PMSF indicando un sitio activo semejante a las de las proteasa del tipo serina. El PMSF inactiva este tipo de proteasas al acilar de manera irreversible el residuo de serina activo (Kumar & Takagi, 1999).

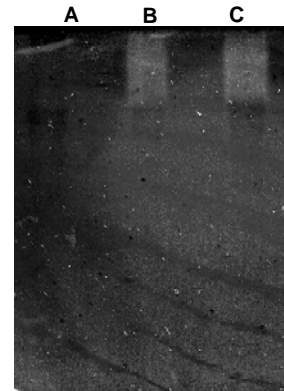


Fig. 5. Ensayo del efecto de los inhibidores clásicos sobre la proteasa detectada A. Muestra +PMSF 10 mM, B. Muestra+ EDTA 10 mM. C. Muestra.

3.4 Efecto de la termoestabilidad y determinación de temperatura y pH óptimos sobre la actividad proteolítica de la enzima por zimografía

Los ensayos de termoestabilidad realizados demuestran que la enzima es capaz de tolerar periodos de incubación de hasta 60 minutos a 55° C sin perder su actividad recuperándose un 100% de la misma. La actividad decrece drásticamente cuando la temperatura es aumentada a 75° C hasta hacerla no detectable por el método empleado (Fig. 6).

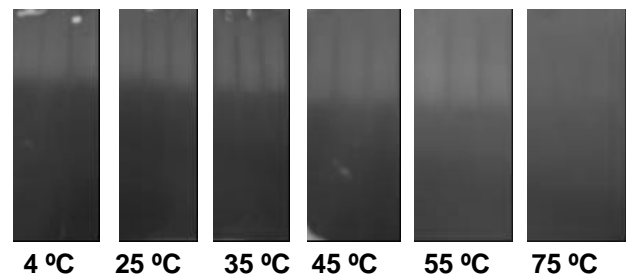


Fig. 6. Ensayo de Termoestabilidad. En estos zimogramas se aprecia la actividad residual recuperada luego de incubarse cantidades del extracto salino a diferentes temperaturas por una hora.

Si comparamos la termoestabilidad de las gelatinasa con los datos previamente reportados para otras proteasas de bacterias termófilas en este caso se encuentran similitudes en cuanto a termoestabilidad, existiendo diferencias en el peso molecular. Los datos de dependencia de la actividad de la gelatinasa en función del pH indican que las proteasa del tipo serina gelatinasa es activa en un intervalo de pH entre 7 y 10 siendo la 6 la de mayor actividad a un pH de 8, es decir se puede clasificar como una gelatinasa alcalina que podría pertenecer al grupo de la subtilisinas sin embargo estudios posteriores en la potenciación de la actividad enzimática en presencia de iones divalentes como Ca^{2+} o Mg^{2+} . Por último al revisar la bibliografía es posible encontrar que todos los organismos alcalófilos ensayados para ser aplicados industrialmente, los microorganismos del género *Bacillus* son los predominantes (De Marco & Dick, 1978; Rao *et al.*, 1998). A pesar de ello y dados los hallazgos en nuestro laboratorio, se demuestra que además de este grupo de versátiles microorganismos existen además organismos mesófilos que producen enzimas con posibles aplicaciones industriales o biotecnológicas, sin embargo el afianzamiento de líneas de investigación en estas áreas conllevarán al posterior descubrimiento de nuevas propiedades de interés comercial (Rawling & Barret, 1993; Rao *et al.*, 1998).

En cuanto a la determinación del pH y la temperatura óptima, se realizaron los geles y luego se cuantificaron las bandas utilizando el programa ImageJ. Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 7 y 8, en donde se observa un pH óptimo de 8, y una temperatura óptima de 55 °C. La actividad detectada puede ser considerada como termófila y alcalófila.

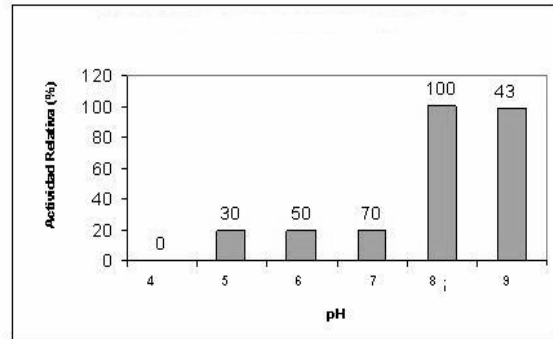


Fig. 7. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

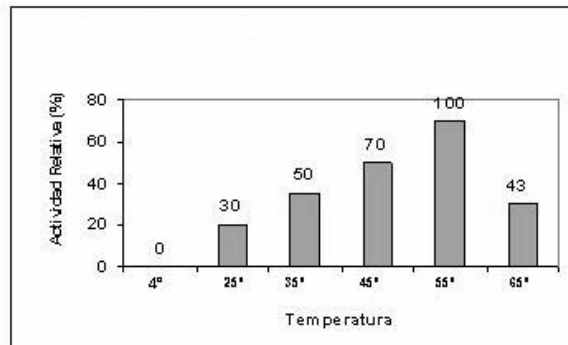


Fig. 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran la presencia, en los homogenatos del fruto de *Thevetia ahouai* de una actividad proteolítica tipo gelatinasa evidenciada mediante placas de agar suplementadas con hemoglobina y gelatina, así como en geles de zimografía, tratándose de una banda simple de 75 kD determinada por SDS-PAGE. Esta actividad demostró ser óptima a una temperatura y pH óptimos de 55°C y 8 unidades de pH, valores característicos de una enzima termófila y alcalófila. La inhibición total de la actividad proteolítica por el PMSF pone en evidencia la presencia de un sitio activo similar al de

las proteasas endopeptidasas tipo serina. La actividad proteolítica resultó termoestable en intervalos de temperatura comprendidos entre los 4° y 75° C, recuperándose un 100% de la actividad luego de una incubación a 55° C por 60 minutos. Por último, los estudios futuros acerca de las características de la actividad detectada determinarán su colocación como una enzima con potencial(es) aplicación (es) biotecnológicas.

5. Agradecimientos

Decanato de la Facyt-UC, Departamento de Biología Facyt-UC y a los asistentes Vicenzo Storaci y Adarelys Andrades. Al Herbario Nacional de Venezuela (VEN).

6. Bibliografía

Amaíz, L. (2003). Identificación y caracterización zimográfica de actividades tipo metaloproteasas extracelulares de bacterias termófilas y posibles usos en el tratamiento de desechos industriales. Trabajo Especial de Grado. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Babé, L. & B. Schindt. (1998). Purification and Biochemical Analysis of WprA, a 52 kD serine protease secreted by *B. Subtilis* as active complex with its 23 kDa propeptide. *Biochim. et Biophys. Acta* 1386: 211-219.

Barett, A. J. (1995). Proteolytic enzymes. Aspartic and metallopeptidases. *Meth. Enzymol.* 248:183.

Beynor, R. & J. Bond. (1994). *Proteolytic enzymes a Practical approach*. Oxford University Press. New York, USA.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Brenner, S. (1988). The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* 334:528-530.

Cerny, G. (1978). Studies on the aminopeptidase test for the distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5:133-122.

Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York.

De Marco, A. & A. J. Dick. (1978). Aminopeptidase I activities in several microorganism. *Can. J. Biochem.* 56:66-71.

Endo, H., A. Huarashina, T. Noro, V. Castro, J. Mora, L. Poveda & P. Sánchez. (1997). Cardenolide Glycosides from *Thevetia ahouai* (L.) A.DC. *Chemi. & pharma. Bul. Journal Article* 45.91536-1538

Fastrez, J. & A. Fersht. (1973). Demonstration of the Acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochem.* 12: 2025-2034.

Felix, F. & N. Brouillet. (1966). Purification and properties of two proteases from brewer's yeast. *Biochem. Biophys. Acta* 122:127-144.

Flores, J., O. Gladiz, A. Canto-Aviles & Flores-Serrano. (2001). Plantas de la flora yucateca que causan algún daño al ser humano. *Rev Biomed* 12:86-96.

Graterol, H., L. Amaíz, E. Torquati, O. Valbuena & M. Contretras. (2005) Detección y caracterización de actividades hidrolíticas en el fruto de *Thevetia ahouai*.

- LV Convención Anual ASOVAC. *Acta Cient. Vzolana*. 56: 43
- Hartley, B. (1960). Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29:45-72
- Kumar, C. & H. Takagi. (1999). *Biotechnol. Adv.* 17:561-594
- Labbe, J., P. Rebegrotte & M. Turpine. (1974). Demonstrating extracellular leucine aminopeptidase (EC3.4.1) of *Aspergillus oryzae* (IP410) leucine aminopeptidase 2 fraction C.R: *Acad. Sci.* 278: 2699
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685
- Lentz, D. (1993). Medicinal and other economic plants of the Paya of Honduras. *Econo. Bot.* 47:358-370.
- Li, E. & A. Yousten. (1975). Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Micr.* 30(3): 354-361.
- Masaki, T., K. Nakamura, M. Isono & M. Soejima. (1978). A new proteolytic enzyme from *Acromobacter lyticus* M497-1. *agrc. Bio. Chem.* 422:1443-1445.
- Medina, J. (2000). Purificación y caracterización de proteasas provenientes de Bacterias Termofilas. Trabajo Especial de Grado. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.
- Morihana, K. (1974). Comparative specificity of microbial proteinases *Adv. Enzymol.* 41: 179-243.
- Pulido- Salas, T. & L. Serralata-Peraza. (1993). Lista anotada de las plantas medicinales de uso actual en el estado de Quintana Roo, México. *CICRO Press*, Chetumal, México.
- Rao, M., A. Tanksale, M. Ghatg & V. Deshpande. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial Proteases. *Microbio. and Mol. Bio. Rev.* 622:597-635.
- Rawling, N. & A. Barret. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 230:205-218.
- Stoll, E., H. Weder & H. Zuber. (1976). Aminopeptidase II from *Bacillus sterothermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* 438: 212- 220.
- Vermelho, A., M. Leal, A. López, S. Gonçalves & M. Branquiha. (1995). Detection of Extracellular Proteases from Microorganisms on Agar Plates. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* 91(6): 755-759.
- Zambrano, E. (2000). Caracterización parcial de exoproteinasas procedentes en reparaciones de exoantigenos de la forma micelial de *Paracoccidioides brasiliensis*. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.