

EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA UTILIZANDO DOS SOLVENTES (AGUA Y Tris HCL) Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA A LOS EXTRACTOS SOBRE LAS CEPAS *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus aureus* – A PARTIR DE HOJAS DE *Pentacalia nítida* (Fam. Asteraceae)

NANCY PAOLA QUINTÍN BUENO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial  
para optar al título de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
Bogotá., D.C. Mayo de 2010

EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA UTILIZANDO DOS SOLVENTES (AGUA Y Tris HCL) Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA A LOS EXTRACTOS SOBRE LAS CEPAS *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus aureus* – A PARTIR DE HOJAS DE *Pentacalia nítida* (Fam. Asteraceae)

NANCY PAOLA QUINTÍN BUENO

APROBADO

---

Dra. INGRID SCHULER, Ph D.  
Decana académica

---

Dra. JANETH ARIAS PALACIOS, M.Sc  
Directora de Carrera

---

Dr. RICARDO VERA BRAVO, Ph.D  
Director

---

Dr. JORGE ROBLES, Ph. D  
Jurado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
Bogotá., D.C. Mayo de 2010

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## Tabla de contenido

---

1.	Resumen	I
2.	Introducción	II
3.	Justificación	III
4.	Marco teórico	IV
4.1	Descripción de <i>Pentacalia nítida</i> fam ( <i>Asteraceae</i> )	IV
4.2	Principales compuestos antimicrobianos derivados de las plantas	IV
4.2.1.	Proteínas	IV
4.2.2	La extracción de proteínas y precipitación con sulfato de amonio	V
4.2.3	Cuantificación de las proteínas	VI
4.3	Enfermedades transmitidas por alimentos	VI
4.3.1	Microorganismos asociados	VI
4.3.1.1	Generalidades <i>Staphylococcus aureus</i>	VI
4.3.1.2	Generalidades <i>Escherichia coli</i>	VII
4.3.1.3	Generalidades <i>Bacillus subtilis</i>	VIII
4.3.1.4	Generalidades <i>Pseudomonas sp.</i>	VIII
5.	Objetivos	IX
5.1	Objetivo General	IX
5.2	Objetivos específicos	IX
6.	Materiales y métodos	X
6.1	Recolección de la muestra	X
6.2	Separación de la fracción apolar	X
6.3	Obtención de la fracción polar	X
6.4	Precipitación con sulfato de amonio	XI
6.5	Cuantificación proteica de los extractos obtenidos	XI
6.6	Electroforesis	XI
6.6.1	Tinción de geles con azul de Coomassie	XII
6.7	Evaluación de la actividad antimicrobiana	XII
7.	Resultados y discusión	1
8.	Conclusiones	19
8.1	Recomendaciones	19
9.	Bibliografía	20

---

## Lista de figuras

---

Figura I Características microscópicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	VI
Figura II Características microscópicas de <i>Escherichia coli</i>	VII
Figura III Características microscópicas de <i>Bacillus subtilis</i>	VIII
Figura IV Características microscópicas de <i>Pseudomonas sp.</i>	VIII
Figura 1. Identificación taxonómica de <i>Pentacalia nítida</i>	1
Figura 2 Extracción de la fracción apolar	2
Figura 3 Distribución de cargas y sitios hidrofóbicos de la proteína	3
Figura 4 Precipitación con sulfato de amonio en el extracto de agua	4
Figura 5 Precipitación con sulfato de amonio en el extracto de Tris HCl	5
Figura 6 Prueba de Biuret	6
Figura 7 Prueba cualitativa con reactivo de azul de Coomassie	7
Figura 8 Electroforesis del extracto proteico en agua	12
Figura 9 Electroforesis del extracto proteico en Buffer Tris HCl	13
Figura 10 Extractos proteicos extraídos en los solventes frente a la cepa <i>E. coli</i>	15
Figura 11 Extractos proteicos extraídos en los solventes frente a la cepa <i>S. aureus</i>	16
Figura 12 Extractos proteicos extraídos en los solventes frente a la cepa <i>Pseudomonas sp</i>	17
Figura 13 Extractos proteicos extraídos en los solventes frente a la cepa <i>B. subtilis</i>	17

---

## **Lista de tablas**

---

Tabla 1 Curva patrón de suero de albumina bovina resuspendido en agua	8
Tabla 2 Curva patrón de suero de albumina bovina resuspendido en Buffer Tris HCl	9
Tabla 3 Concentración de proteínas de la fracción extraída con agua desionizada	10
Tabla 4 Concentración de proteínas de la fracción extraída con Buffer Tris HCl	11

## **Lista de gráficos**

---

Grafico 1 Curva patrón BSA diluido en agua desionizada	8
Grafico 2 Curva patrón BSA diluido en Buffer Tris HCl (pH 7.032)	9

## 1. RESUMEN

Los extractos acuosos proteicos de las hojas de *Pentacalia nítida* fueron obtenidos por medio de dos solventes agua desionizada y Buffer Tris HCl a pH 7; estos extractos se precipitaron a diferentes porcentajes de saturación con sulfato de amonio, (20,40, 50, 60, 80 y 90 %), siendo el porcentaje de saturación del 20% el mejor para la precipitación de proteínas en el extracto de agua y 80 % para la precipitación proteica con Buffer Tris HCl, Estos resultados se confirman tras realizar pruebas cualitativas y cuantitativas, revelando que la concentración más alta fue de 1.141 mg/mL de proteínas, halladas en el extracto con Buffer Tris HCl; siendo éste el mejor agente extractor.

Posteriormente, se realizó un corrido en gel SDS – PAGE al 12% que evaluó el peso molecular de las proteínas obtenidas.

Se evaluó la capacidad antagónica de las proteínas obtenidas con las cepas bacterianas, Gram-negativas: *Pseudomonas sp.* y *Escherichia coli* y Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, utilizando el método de “difusión en agar, medio Mueller Hinton”. Las bacterias fueron resistentes a los extractos proteicos por lo tanto no se encontró actividad antimicrobiana.

## 2. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos, las plantas han sido utilizadas como agentes terapéuticos, debido a su fácil disponibilidad, bajo costo y efectos secundarios mínimos. (Saska et al 2008). Las especies del género *Pentacalia*, familia *Asteraceae*, se caracterizan por ser arbustos aproximadamente de 3 m de altura, presenta inflorescencia, de hojas anchas y se encuentran en los páramos andinos colombianos, hábitat con altitudes entre los 2.500 y los 3.800 m.s.n.m. Son consideradas ricas en la producción de metabolitos secundarios. (Cortes et al 2001)

Estudios de fitoquímica han revelado que las plantas despliegan diferentes barreras o mecanismos de defensa contra ciertos patógenos, entre los que destacan la participación de proteínas de defensa que actúan inhibiendo el desarrollo de microorganismos en la planta huésped. (Álvarez et al 2003; Broekaert et al 1995; Carvalho et al 2000; Saska et al 2008; McCown et al 1967). El Grupo de Investigación de Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ) ha venido extrayendo proteínas, de diferentes especies de *Pentacalia*, principalmente de las hojas; con dos solventes: agua desionizada y Tris HCL. Evaluando posible actividad antimicrobiana en estas plantas (Tobo 2009).

La industria de alimentos se ve afectada por microorganismos que alteran el alimento o pueden causar enfermedades entéricas, tales como los bacilos Gram negativos *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp*, el bacilo Gram positivo *Bacillus subtilis* y el coco Gram positivo *Staphylococcus aureus*; productores de exotoxinas y endotoxinas que causan daños a nivel gastrointestinal, son resistentes a muchos antibióticos, ocasionan intoxicación y alteraciones en los alimentos (Doyle 1997). Los microorganismos mencionados anteriormente generan grandes problemas en la industria de alimentos ya que pueden ocasionar pérdidas económicas muy altas.

Por lo tanto se requiere la búsqueda de nuevos productos naturales que permitan el control de tales microorganismos y la prevención de las enfermedades que generan, beneficiando a los consumidores y a la industria de alimentos; en este trabajo se pretendió extraer la fracción proteica utilizando dos solventes (agua y Tris HCL) para la determinación de su actividad antimicrobiana sobre las cepas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus aureus*, a partir de hojas de *Pentacalia nítida*, (Fam. *Asteraceae*)

### 3. JUSTIFICACIÓN

El páramo es un ecosistema que genera aportes en cuanto a las reservas de especies endémicas de gran diversidad. La investigación y adquisición de conocimientos sobre la flora de este bioma ofrece mayores alternativas para la obtención de productos naturales con actividad farmacológica (Cortes et al 2001)

Los estudios de los diferentes componentes de las plantas del genero *Pentacalia*, han demostrado ser de interés, con fines experimentales ya que se sabe que este género contiene metabolitos secundarios importantes con actividad citotóxica (Pedrozo, 2006) contra líneas tumorales, inhibidores de antagonistas, compuestos con actividad anti-inflamatoria y antibacteriana, (Romero 2008; Cortes et al 2001; Pedrozo 2001; Torrenegra, 2000) evaluados por otros estudios realizados por el grupo de investigación fitoquímica de la universidad Javeriana (GIFUJ).

Esta investigación evalúa los extractos proteicos acuosos obtenidos de *Pentacalia nítida*, lo cual, persiguió reconocer el potencial de dichos extractos, así como su acción sobre patógenos que dan lugar a las denominadas **Enfermedades Transmitidas Por Alimentos** (ETAS) ocasionadas por los microorganismos *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona sp* y *Staphylococcus aureus*.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 *Pentacalia nitida* Cuatr. (Asteraceae)

Son arbustos autóctonos de los páramos andinos colombianos (altitudes entre 2500-3800 m.s.n.m.), principalmente, de los que circundan a la ciudad de Bogotá; se les utiliza en la medicina tradicional como: vulnerarias, antisifilíticas, para tratar forúnculos rebeldes, contra úlceras y también ha sido usado para curar la faringitis (García 1975; Cuatrecasas 1969)

### 4.2 Principales compuestos antimicrobianos derivados de plantas

Las plantas originan una gran cantidad de metabolitos secundarios como protección contra ataques microbianos y de insectos. Muchos de estos compuestos se han utilizado de forma pura o extractos vegetales como alimento o aplicaciones médicas para el hombre (Lizcano et al 2008). Sin embargo, no todos los componentes químicos elaborados por la planta poseen igual interés para la Fitoquímica. Los denominados principios activos son frecuentemente alcaloides, glúcidos, grasas y proteínas, que presentan importancia dietética y muchos como los almidones y las gomas, se emplean en la industria farmacéutica, aunque carecen de presentar acción farmacológica.

#### 4.2.1 Proteínas

Las proteínas son polímeros lineales de  $\alpha$  - aminoácidos, éstos están unidos por enlaces peptídicos y tienen amplia variabilidad estructural y funcional. Estas biomoléculas están formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Debido a su gran tamaño, cuando estas moléculas se dispersan en un solvente adecuado, forman soluciones coloidales, con características que las distinguen de las soluciones de moléculas más pequeñas. (Yábar 2005).

La organización de una proteína viene definida por cuatro niveles estructurales denominados: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria. Cada una de estas estructuras informa de la disposición de la anterior en el espacio. Se pueden clasificar según su función, su composición, y su conformación. Las funciones que cumplen son muy variables; las más destacadas son, estructurales, enzimáticas, hormonales, reguladoras, defensivas, de transporte y de reserva, entre otras (Prescott 2004).

Los investigadores de la universidad Católica de Leuven han aislado y caracterizado una nueva clase de péptidos antimicrobianos en la planta *Mirabilis jalapa*, cuyo artículo titula "Aislamiento y caracterización de una nueva clase de péptido antimicrobiano de la planta *Mirabilis jalapa* L."; donde destaca que los péptidos tienen un amplio espectro en las bacterias Gram positivas pero no son tóxicos para las bacterias Gram negativas. (Cammue

1991), muchos artículos se encuentran hoy en día sobre el estudio de aislamiento de proteínas y péptidos que generan respuesta contra diversos tipos de microorganismos que son nocivos, por lo tanto es de gran interés investigar plantas nativas las cuales pueden presentar una actividad de amplio espectro antibacterial o antifúngica que afectan el entorno donde habitan estas plantas.

#### 4.2.2 La extracción de proteínas

Es un proceso que cuenta con varias etapas cuyo objetivo es lograr la concentración diferencial de la proteína o péptidos de interés. Los factores a tener en cuenta en cada etapa del fraccionamiento son solubilidad, pH, grado de oxidación, presencia de metales pesados, polaridad y fuerza iónica de la solución, presencia de proteasas, temperatura y actividad de la molécula. (Paxton 1991)

En cuanto a la **precipitación de proteínas con sulfato de amonio**, las proteínas son solubles gracias a su interacción con el agua, al añadir el sulfato de amonio se unen al agua formando puentes de hidrogeno, la proteína se deshidrata y las biomoléculas interactúan hidrofóbicamente entre ellas y forman el precipitado, la proteína menos soluble en solución se une a las sales presentes (sulfato de amonio). (Allen 2004.)

El objetivo principal es remover una cantidad importante de remanentes que pueden ser ácidos nucleicos, toxinas y otros compuestos. Existen varias estrategias para precipitar las proteínas, como el cambio de pH, el incremento en la temperatura, la adición de solventes, las moléculas cargadas, etc., pero, el método más comúnmente empleado es la precipitación por salado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . (Allen 2004.)

La solubilidad de una proteína es sensible a la concentración de una sal la concentración de sal se expresa en términos de fuerza iónica. La solubilidad de una proteína a baja fuerza iónica generalmente aumenta con la concentración de sal. El salting in es el fenómeno por el cual la concentración de sal aumenta la solubilidad de la proteína. A altas fuerzas iónicas, la solubilidad de las proteínas disminuye, este fenómeno es conocido como salting out. Este fenómeno se da básicamente por la competencia por las moléculas de agua que forman parte de la capa de solvatación (Larrahondo 2001).

La mayor parte de las proteínas presentan una capa de agua (capa de solvatación) que se encuentra asociada y cercana a su superficie. Al incrementar la concentración de los iones de sal la capa de solvatación disminuye. Las interacciones de tipo hidrofóbico entre los residuos apolares de la proteína, se presentan gracias al plegamiento o bien por la asociación entre proteínas, produciendo su precipitación. Debido al uso extensivo de este método, que además es económico, se han diseñado tablas y formulas en las que se pueden determinar las cantidades a añadir de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido o en solución, a una mezcla de proteínas para obtener una concentración dada. (Allen 2004.)

Después de la precipitación, la proteína es resuspendida en el solvente y las trazas de agente precipitante se retiran por diferentes formas que pueden ser la diálisis, la ultrafiltración o bien el paso por una columna de exclusión molecular. (Allen 2004.)

#### 4.2.3 Cuantificación de las proteínas

El contenido proteico dependiendo de la naturaleza de la molécula puede ser determinado mediante el “Método de Bradford” el cual se basa en la unión del colorante azul de Comassie G250, a los residuos de los aminoácidos arginina y lisina de la proteína (Walker 2002). Esto es usualmente realizado para medir la absorbancia de la solución en el espectrofotómetro.

#### 4.3 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades de origen alimentario, se pueden presentar en cualquier lugar, predominando aquellos donde se practican malos hábitos higiénicos y/o sanitarios y en lugares en condiciones de hacinamiento. Constituyen una causa importante, de mortalidad en países industrializados y en vía de desarrollo (Vásquez 2003).

##### 4.3.1 Microorganismos asociados

###### 4.3.1.1 *Staphylococcus aureus*

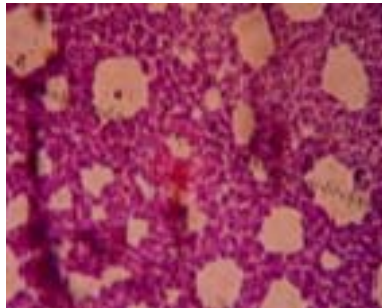


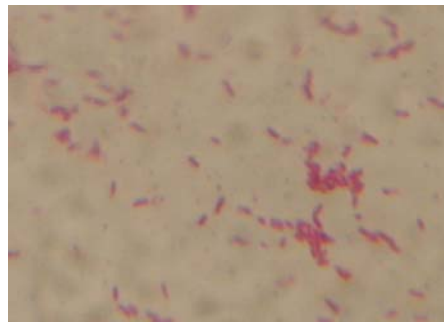
Figura I Características microscópicas de *Staphylococcus aureus* (Quintín 2010)

Son coco Gram positivos de 0.5 -1  $\mu\text{m}$  de diámetro, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, caracterizados por su agrupación en forma de racimo. Crecen a una temperatura óptima de 37°C y se desarrollan mejor en un pH ligeramente alcalino de 7.6. Tiene la capacidad de fermentar glucosa lo cual favorece a su crecimiento, también fermenta maltosa, manitol y trehalosa. Para su identificación son catalasa positiva, oxidasa negativo, poseen una enzima, la coagulasa, que los diferencia del resto de las especies del género; esta tiene la facultad de reaccionar con el fibrinógeno dando lugar a un coágulo de fibrina. Poseen igualmente una desoxirribonucleasa (DNAsa ) que es una nucleasa que depolimeriza el ADN. A esta enzima se la denomina termonucleasa por ser termoresistente en las cepas de *S. aureus*. (Peñaranda 2003).

Poseen una pared celular que contiene peptidoglucano y ácido teicoicos, son sensibles a la  $\beta$ - lactamasa, a las tetraciclinas, a los macrólidos, a la novobiocina y al cloranfenicol. Elaboran diversas enzimas: proteasas, lipasas, fosfatasas, gelatinasas, catalasas y coagulasas. (Doyle 1997).

*S. aureus* ha sido caracterizado ampliamente. Este organismo produce una diversidad de productos extracelulares. Varios de éstos, que incluyen las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), son factores de virulencia que han sido implicados en enfermedades de las personas como la gastroenteritis en todo el mundo. (Doyle 1997)

#### **4.3.1.2 *Escherichia coli***



**Figura II Características microscópicas de *E. coli* (Quintín 2010)**

Bacilo Gram negativo de 1 – 3  $\mu\text{m}$  por 0.5  $\mu\text{m}$ , en general es móvil (flagelos peritricos), aunque existen variantes inmóviles no flageladas. No forman esporas y por lo general no tiene cápsula. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C; el pH favorable es de 7. (Peñaranda 2003)

Fermenta lactosa, glucosa, indol positiva, rojo de metilo positiva, Voges Proskauer (VP) negativa y no utiliza el citrato. Produce  $\text{H}_2\text{S}$  en determinados medios. (Peñaranda 2003)

Las cepas de *E. coli* son una parte común de la microflora anaeróbica facultativa normal del tracto intestinal de las personas y animales de sangre caliente. Los aislamientos se diferencian en base a tres antígenos de superficie principales que permiten el serotipado: los antígenos O (somáticos), H (flagelos) y K (cápsula). La mayoría de los organismos de las cepas de *E. coli* son comensales inofensivos; sin embargo, algunas cepas son patógenas y provocan enfermedades diarreicas. (Doyle 1997)

Las cepas de *E.coli* que provocan enfermedad diarreica por la ingesta de alimentos contaminados, se clasifican en grupos específicos basados en propiedades de virulencia como la producción de enterotoxinas y algunas tiene genes de invasión, *E. coli* O157: H7 produce factores citotóxicos, la verotoxina que produce daño en la síntesis del mRNA. (Doyle 1997).

#### 4.3.1.3 *Bacillus subtilis*

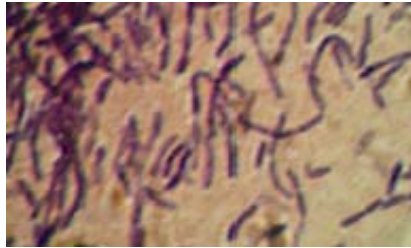


Figura III Características microscópicas de *B. subtilis* (Quintín 2010)

Son bacilos Gram positivos de tamaño de 1 por 8  $\mu\text{m}$ , inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, formadores de endosporas. Habitan en el suelo, agua y aire. (Lizcano et al 2008).

Se encuentra con frecuencia en tierra y en vegetales, también se encuentra en diversos productos alimenticios, produciendo infecciones aéreas o por contacto, se considera un microorganismo perjudicial pero no peligroso en carne en la cual ataca las proteínas. Este bacilo hidroliza el almidón y reduce los nitritos, no produce indol a veces forma una escasa cantidad de ácido sulfúrico, sus esporas son resistentes a temperaturas mayores a 180°C. (Lizcano et al 2008).

#### 4.3.1.4 *Pseudomonas sp.*

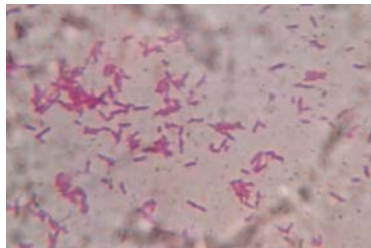


Figura IV Características microscópicas de *Pseudomonas sp.* (Quintín 2010)

*Pseudomonas* Bacilo Gram negativo es psicrotrófica que con mayor frecuencia se encuentran en las leches en refrigeración (Cortes et al 2001). *Pseudomonas* constituye uno de los grupos más complejos, son cosmopolitas y su ubicuidad les permite colonizar cualquier sustrato imaginable, son colonizadoras de las raíces de las plantas hasta casi formar una simbiosis, son capaces de poner en forma asimilable el hierro, imprescindible en la función clorofílica vegetal, algunas tienen un marcado carácter antagonista frente a otros microorganismos. *Pseudomonas* es una bacteria que posee células en forma de varillas rectas o ligeramente curvadas y móvil mediante uno o varios flagelos polares, aerobio. Se describe como una bacteria asociada al fotoplano y a la rizósfera, si la bacteria es introducida en la semilla o material de siembra, puede controlar enfermedades patogénicas del suelo y promover el crecimiento al suprimir otros organismos dañinos (Botero M. 1999).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Extraer la fracción proteica utilizando dos solventes (agua y Tris HCL) para la determinación de su actividad antimicrobiana sobre las cepas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus aureus* a partir de hojas de *Pentacalia nítida*, (Fam. Asteraceae)

### 5.2 Objetivos Específicos

- a. Obtener los extractos acuosos proteicos (fracción polar) utilizando dos solventes agua y buffer Tris HCl a partir de hojas de *Pentacalia nítida* perteneciente a la familia Asteraceae.
- b. Determinar la concentración de sulfato de amonio adecuada para la obtención de un mayor precipitado a partir de los extractos proteicos de hojas de *Pentacalia nítida* (Fam. Asteraceae).
- c. Cuantificar las proteínas precipitadas de los extractos proteicos.
- d. Comparar los corridos electroforéticos de los extractos proteicos obtenidos con los solventes agua y Tris HCl.
- e. Determinar la actividad antimicrobiana sobre las cepas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus aureus* de la fracción proteica.
- f. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Pentacalia nitida* (Fam. Asteraceae), que presenten mayor inhibición ante las cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus aureus*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Las variables que se utilizaron en el presente trabajo de grado contribuyeron a determinar si los extractos proteicos obtenidos de *Pentacalia nítida* tienen propiedades antimicrobianas.

- **Independiente:** concentración en mg/mL de proteínas extraídas con agua desionizada y Tris HCl y, tipo de microorganismo.
- **Dependiente:** absorbancias obtenidas en la técnica de Bradford modificado, para cada extracto obtenido y tamaño de Halo de inhibición medido en mm.

### 6.1 Recolección de muestras

Las muestras vegetales de las especies *Pentacalia nítida* pertenecen a la familia *Asteraceae* se recolectaron en el páramo de “Choachi”, al Sureste de la Ciudad de Bogotá, a una altitud de (3.115 m.s.n.m.); la muestra se tomó en óptimo estado fitosanitario y de desarrollo vegetativo, el material se secó a temperatura ambiente, posteriormente se realizó una separación de las hojas, para utilizarlas como la muestra de interés. Cada una de las muestras fueron picadas en un molino eléctrico marca Salvato (tamiz de poro 0.3 cm). Un ejemplar de la especie vegetal fue determinado por el Sr. Santiago Díaz, en el Herbario de Nacional de Colombia de la ciudad de Bogotá D.C., con número de colección N° 531038.

### 6.2 Separación de la fracción apolar con los solventes: bencina de petróleo y diclorometano de las hojas de *Pentacalia nítida* (fam: *Asteraceae*)

La fracción lipídica a partir de las hojas de *Pentacalia nitida* fue extraída mediante el proceso de maceración en frío, en una proporción 1:3, material vegetal – bencina de petróleo, la extracción se realizó durante 48 horas a temperatura ambiente, repitiendo tres veces consecutivas este proceso; para separar totalmente la fase lipídica contenida en el material de partida se realizó una nueva extracción de 48 y otra de 24 horas posteriormente con diclorometano. El solvente se separó utilizando papel de filtro poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y con ayuda del rotaevaporador se concentró el material solubilizado y se recuperó la bencina de petróleo y el diclorometano.

El material se secó a temperatura ambiente, se distribuyó en un área cerrada y amplia para permitir el flujo de aire y protegerlo de los rayos del sol. Una vez seco, el material se molió, este es un paso importante que permite el rompimiento de la pared celular para exponer los compuestos intracelulares y extracelulares (Scopes. 1994) para ser extraídos posteriormente.

Se efectuaron tres extracciones consecutivas de la fracción apolar con un volumen inicial de 3.4 L de bencina de petróleo. En seguida se hizo una nueva serie de extracciones con diclorometano, el cual generó un cambio de color.

Los extractos acuosos del género *Pentacalia nitida*, se conservaron en frasco ámbar para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos, los extractos se filtraron dos veces al vacío con papel de poro de 0.45 µm y posteriormente se realizó una centrifugación de 3250 rpm por 20 minutos todo esto para eliminar material grueso o contaminante.

Después de la centrifugación, los compuestos susceptibles pueden acidificarse y oxidarse, en la mayoría de las plantas. Estas contienen compuestos fenólicos que se oxidan, principalmente bajo la influencia endógena de la enzima fenol oxidasa, dando un pigmento de color oscuro; estos pigmentos se unen a la proteína y reaccionan covalentemente. Para evitar este tipo de reacciones es útil usar compuestos con tiol, tales como el β- mercapto etanol, que minimiza la acción de la enzima fenol oxidasa. La adición de polivinilpirrónico es frecuentemente utilizada ya que absorbe los compuestos fenólicos. (Scopes 1994).

### **6.3 Obtención de la fracción polar con los solventes agua y Tris HCl pH 7 (extracto proteico) a partir de las hojas de *Pentacalia nitida***

El material vegetal residual, se dejó secar a temperatura ambiente y luego se dividió en dos partes iguales para continuar con el proceso de maceración en frío, para luego obtener la fracción polar se utilizó los solventes agua desionizada o Buffer Tris HCl a pH de 7 en una proporción 1:4. Esto se preparó en frascos de vidrio ámbar a temperatura ambiente con agitación suave durante 24 horas, para obtener el extracto acuoso proteico. El material se filtró para separar el material vegetal residual del solvente acuoso.

### **6.4 Concentración de los extractos mediante precipitación con sulfato de amonio.**

Se precipitó las proteínas de los extractos acuosos mediante la técnica conocida como "salting-out" o precipitación con sulfato de amonio, según la metodología propuesta por Harris y Angal, 1994. Se tomó seis alícuotas de 10 mL del extracto acuoso de hojas de *Pentacalia nitida* tanto en solución con Buffer Tris HCL como con H<sub>2</sub>O desionizada. Después se calcularon los gramos de sulfato de amonio necesarios para obtener un 20, 40, 50, 60 y 80 y 90 % de saturación, se adicionó poco a poco el sulfato de amonio para cada alícuota agitando durante una hora a 4°C. Posteriormente se centrifugó cada alícuota a 4500 rpm durante 30 minutos, se retiró el sobrenadante y los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 1mL de Buffer Tris HCL o H<sub>2</sub>O desionizada según fuera el caso. A continuación se determinó la cantidad de proteína presentes utilizando el método de Bradford para determinar la proporción de sulfato de amonio adecuada. Esta determinación se realizó por duplicado.

Con los extractos acuosos obtenidos se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de sulfato de amonio al 20, 40, 50, 60, 80 y 90%; para determinar en cuál de éstas, era el agente precipitante más adecuado para obtener la mayor cantidad de proteínas. Una de las sales comúnmente utilizadas es el sulfato de amonio, porque causa precipitación selectiva, es económico, y es suficientemente soluble (Bollag 1996).

Con el fin de determinar los gramos necesarios para alcanzar el porcentaje de saturación con sulfato de amonio para un litro de agua, se utilizó la fórmula publicada en **purification methods: a practical approach** de la Universidad de Oxford (Harris et al. 1994), donde  $S_1$  es la concentración inicial y  $S_2$  es la concentración final de sulfato de amonio, ésta ecuación permite el aumento de volumen que se produce sobre la adición de sal (Harris et al 1994).

$$G = \frac{533 (S_2 - S_1)}{100 - (0.3 * S_2)}$$

Estos valores fueron corroborados teniendo en cuenta las publicaciones **Protein Purification** de Robert Scopes y **Protein Methods** de Daniel Bollag, en donde se hallaron iguales condiciones de trabajo; adicional se hizo la revisión en la página web: (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>) donde se ratifica valores de la ecuación utilizada.

### **6.5 Cuantificación proteica de los extractos concentrados.**

La cuantificación proteica total de los extractos utilizados, se realizó por medio de la técnica de Bradford modificada, que se elaboró en placas de Elisa. El montaje de la placa se efectuó, adicionando 20  $\mu$ L de cada uno de los extractos por duplicado, utilizando los pozos consecutivamente, posteriormente se elaboró dos curvas de calibración, utilizando suero de albúmina bovina (BSA) 0.15M con Buffer Tris HCl y agua desionizada. Todas las muestras serán sometidas a la acción de 100  $\mu$ L de reactivo de Bradford (0.01% Coomassie Blue G-250, 4.75% Etanol, 85%  $H_3PO_4$ ) luego se homogenizará y se dejará 15 minutos de reposo. Finalmente se evaluará la concentración del compuesto coloreado midiendo a 620 nm en un Lector de Microplaca - Anthos 2020 versión 2.0.5.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores que evidencian la proporción de sulfato de amonio adecuado se procederá a la precipitación de la proteína contenida en el extracto total y su cuantificación.

## 6.6 Electroforesis

La electroforesis se realizó en gel de acrilamida (12% p/v) de acuerdo a la tabla I, teniendo en cuenta la concentración final de acrilamida y bisacrilamida ó %T que en este estudio se utilizó a una concentración peso/volumen de 12%, metodología proporcionada en el Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo. Para los dos extractos proteicos (Agua y Tris HCl) por duplicado.

Gel de separación para 12%

Agua desionizada	3.35 mL
Buffer Tris HCl pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL
Acrilamida / Bisacrilamida	3.3 mL
Persulfato de amonio*	60 µL.
Temed*	20 µL.

\* Se agrega al final y al mismo tiempo

Los geles son polimerizados entre superficies de vidrio con una separación entre si de 0.75 mm. La mezcla disolución de acrilamida se vierte en la cavidad entre los cristales con ayuda de una pipeta, dejando aproximadamente 1.5 cm al borde superior, se adicionó agua destilada para evitar el contacto con el aire. Se formaron los pocillos donde posteriormente se depositó las muestras con un volumen final de 16 µL primero la muestra concentradas, después el patrón de peso molecular, posteriormente las diluciones 1/5 y 1/10, se revisó que no hallan quedado huecos ni burbujas con aire que ofrezcan resistencia al paso de la corriente y produzca efectos indeseados en la migración de las proteínas. Para los dos extractos proteicos obtenidos se hizo por duplicado.

**6.6.1 Tinción de geles con azul de Coomassie:** tras la electroforesis los geles se sumergieron completamente en solución de fijación. A continuación se lavaron tres veces durante 10 minutos en agua destilada. Seguidamente, los geles se sumergieron durante toda la noche en la solución de tinte que contiene azul brillante de Coomassie (G-250). Por último los geles se destiñen con ayuda de un agitador y utilizando cambios frecuentes de agua destilada hasta que las bandas se evidencien claramente.

## 6.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad de los extractos proteico se realizó por el método de pozos en agar la cual consiste en abrir pozos de 5.5 mm en agar Mueller Hinton El agar favorece de manera considerable el crecimiento de los microorganismos exigentes, por su composición de infusión de carne, hidrolizado de caseína y almidón se colocó en una caja control positivo con el antibiótico de amplio espectro el Cloranfenicol y control negativo se colocó agua, se

realizó por duplicado. Se preparó la suspensión de cada una de las cepas en caldo nutritivo, de acuerdo al tubo 0.5 del patrón de Mac Farland, posteriormente se inocularon 0.1mL de las suspensiones en las cajas de Petri con medio Mueller Hinton y se sembró masivamente. Cada caja contenía los pozos correspondientes a las muestras concentradas de los extractos proteicos provenientes de los solvente Tris HCl y agua desionizada. Esto se realizó por duplicado. Se incubaron las cajas a temperatura 37 +/- 2°C por 24 horas. Se midieron halos de inhibición frente a los microorganismos. Se considera como positivo cuando el halo supera 1 mm de inhibición (kalembe et al 2003).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra del material recolectado fue enviada al Herbario Nacional Colombiano (COL), que confirmó la especie de la planta.

Nombre: *Pentacalia nítida* (Kunth) Cuatrec.

Familia: *Asteraceae*

Nº COL: 531038

Colector: Álvaro Granados Guzmán

Determinado: Santiago Díaz



Fig. 1. Nombre: *Pentacalia nítida* (Kunth) Cuatrec.

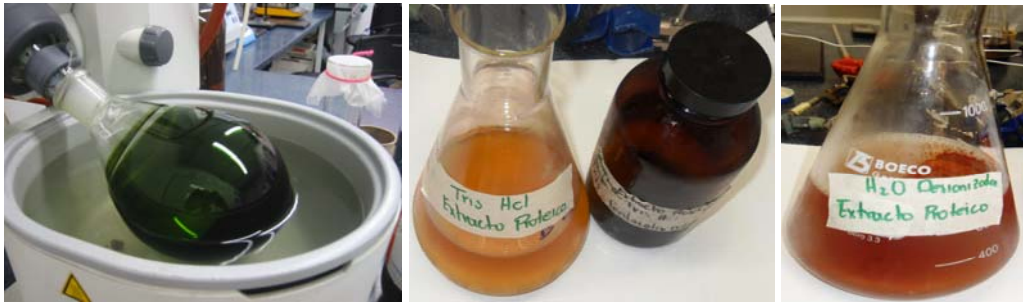
Familia: *Asteraceae*

Nº COL: 531038

Colector: Álvaro Granados Guzmán

Determinado: Santiago Díaz

**Figura 1. Identificación taxonómica de *Pentacalia nítida* (Kunth) Cuatrec (Pedrozo 2001)**

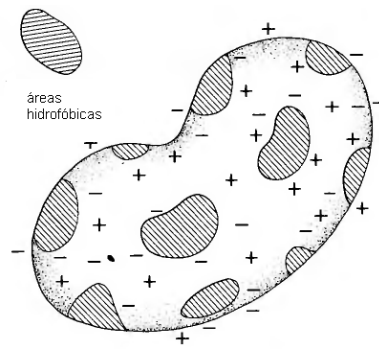


**Figura 2. Cambio de color de los extractos después de la extracción de la fracción apolar (Quintín 2010)**

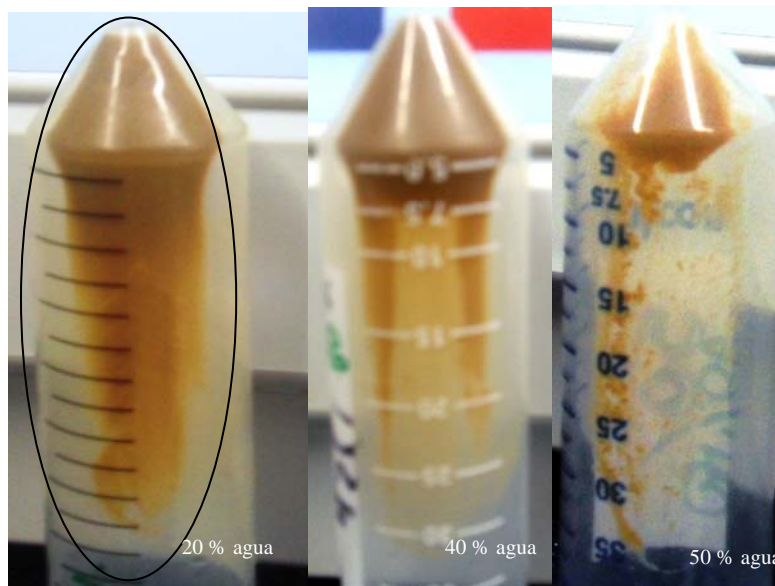
La figura 2 indica como la clorofila es extraída por disolventes de baja polaridad, con la bencina de petróleo y el diclorometano. La clorofila se adhiere a los solventes y da como resultado un pigmento de color oscuro. Las sustancias extraíbles en solventes de baja polaridad varían en cuanto a su cantidad y composición, según el disolvente que se utilice para su extracción, se ha demostrado la presencia de aceites esenciales, pigmentos verdes (clorofila), carotenoides, vitaminas liposolubles y lípidos neutrales” (Diaz.1998).

La fracción lipídica extraída se entregó al grupo de investigación de Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ), para posteriores estudios y aplicaciones.

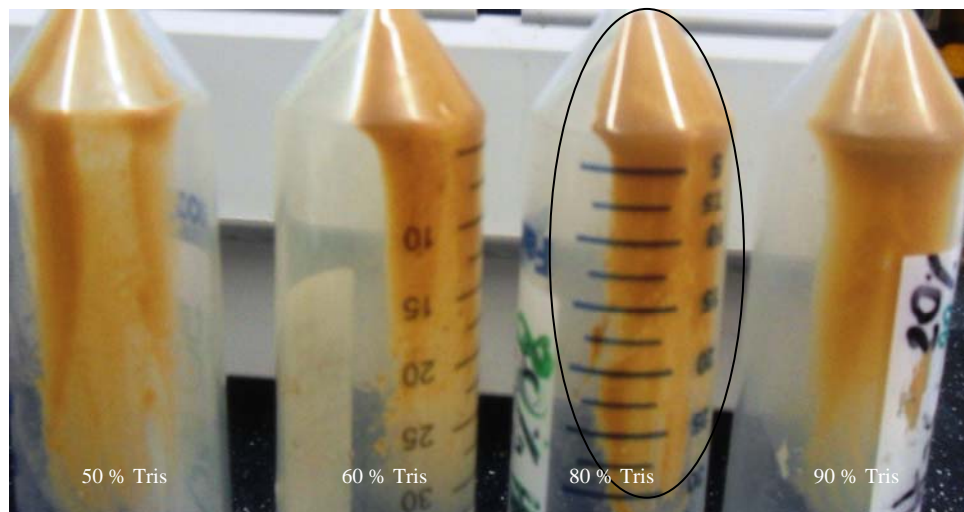
La solubilidad, es una propiedad que permite la clasificación de las proteínas, depende de la distribución de los sitios hidrofílicos e hidrofóbicos en la superficie de la proteína. Una molécula típica de proteína en solución tiene sitios hidrofóbicos en la superficie (cadena lateral de Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Met, Val), obligando a éstos a entrar en contacto con el solvente acuoso, causando un ordenamiento en la moléculas y adhiriéndolas alrededor de las cadenas laterales, creando núcleos hidrofóbicos. (MacCown et al 1967). Los sitios hidrofílicos de las proteínas entran en contacto con el agente extractor, según sea el caso, agua o Buffer Tris HCl; formando puentes de hidrogeno y facilitando de esta forma la extracción. El Tris HCL es utilizado habitualmente como buffer con capacidad de atravesar la membrana celular, manteniendo su pH y las condiciones para evitar cambios drásticos en el medio circundante (Bollag et al 1996)(Fig. 3).



**Figura 3. Distribución de las cargas y sitios hidrofóbicos sobre la superficie de una proteína (MacCown et al 1967)**



**Figura 4. Precipitación con sulfato de amonio al 20 40 Y 50 % en el extracto proteico con el agua desionizada. (Quintín 2010)**



**Figura 5. Precipitación con sulfato de amonio al 50, 60, 80 y 90% en el extracto proteico con Buffer Tris HCl (Quintín 2010)**

Los resultados cualitativos obtenidos muestran que la concentración de sulfato de amonio al 20 % en el extracto de agua desionizada fue la mejor (figura 4), mientras que el mejor porcentaje de saturación para buffer Tris HCl es del 80% (figura 5).

Las proteínas fueron precipitadas por el método de “salting out”, en donde la mayoría de las proteínas presentan una capa de agua alrededor (capa de solvatación) que se encuentra cercana a su superficie, a altas concentraciones de sal, la capa de solvatación interactúa con los iones de sulfato y amonio, permitiendo que la solubilidad de las proteínas disminuyan drásticamente hasta producir su precipitación (Allen T 2004).

Estos resultados fueron confirmados con las pruebas cualitativas y cuantitativas para proteínas que se realizaron posteriormente.



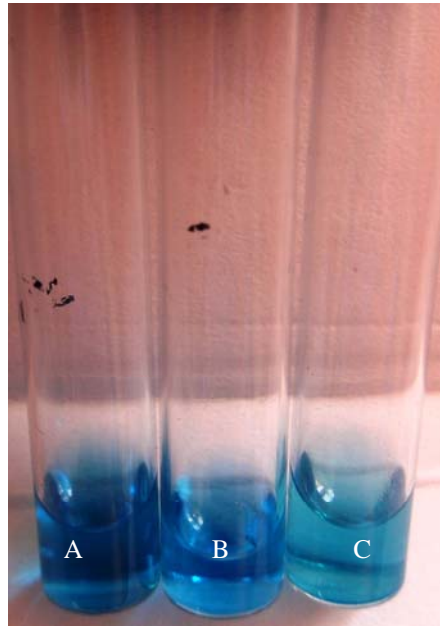
**Figura 6. Prueba de Biuret.**

**A. blanco B. muestra del extracto proteico C. control positivo con suero de albumina Bovina (BSA)  
(Quintín 2010)**

En la figura 6 se observa que la reacción de biuret es negativo; debido a que el sulfato de amonio es un interferente en ésta reacción, el sulfato de amonio forma complejos con el cobre impidiendo la claridad del resultado. Esta reacción se emplea de acuerdo con las necesidades del investigador pero no es usualmente utilizada debido a su baja sensibilidad (rango 1 -5 mg de proteína/mL). (Scopes. 1994).

La prueba de Biuret fue utilizada para detectar la presencia de enlaces peptídicos, el reactivo contiene el ion cobre (II) que al unirse al enlace péptico, produce un complejo cobre-proteína que se evidencia con una coloración púrpura en una solución fuertemente alcalina (fig. 6 C). (Harris et al 1994)

Prueba cualitativa de Bradford con el reactivo de azul de Coomassie.



**Figura 7. Prueba cualitativa con reactivo azul de Coomassie G-250.  
A. muestra del extracto proteico, B. control positivo BSA y C. Blanco**

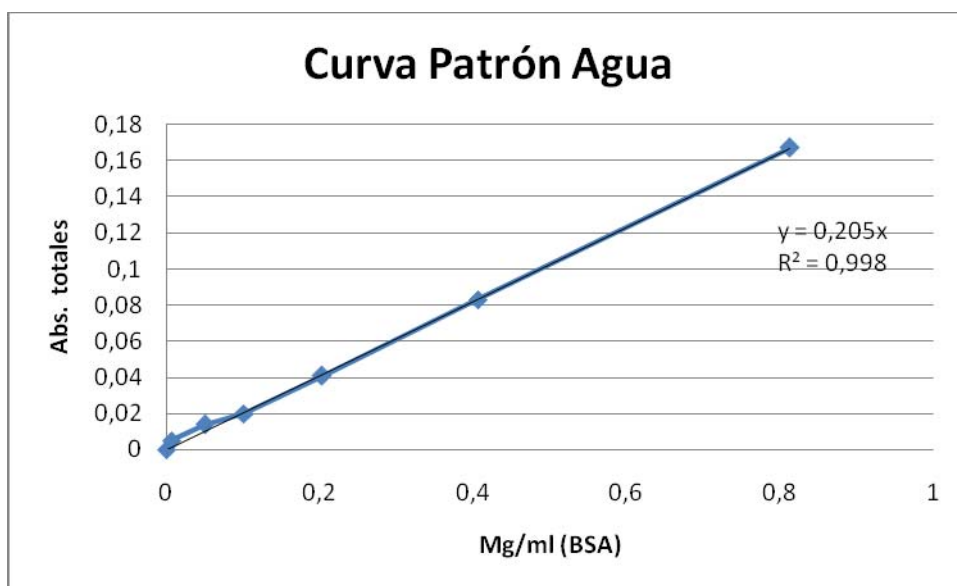
La figura 7 evidencia que la prueba con el reactivo azul de Coomassie G-250 para proteínas, es positiva. Funciona por la acción del colorante azul de Coomassie, éste contiene seis grupos fenilo y dos grupos sulfonato que interacciona con la proteína débilmente, no covalentemente y se produce hidrofóticamente (triptófano, tirosina, leucina y fenilalanina) o electrostáticamente (arginina y lisina) (Ahmed.2000).

Este método colorimétrico es confiable por su sensibilidad (rango desde 0.2 mg de proteína/mL), y análisis rápido. El reactivo no se ve afectado por muchos productos químicos como la sacarosa, la úrea, la glicerina, ni el Tris en concentraciones menores a 2 M, (Ahmed 2000). El agente extractor Buffer Tris Hcl para este estudio se le calculó la concentración molar y se obtuvo que es de 0.2M para evitar interferencia en las pruebas.

La cuantificación de las proteínas se realizó posteriormente por el método de placa Bradford modificado (Ahmed.2000).

**Tabla 1. Curva patrón con Suero de Albumina Bovina (BSA) disuelto en agua**

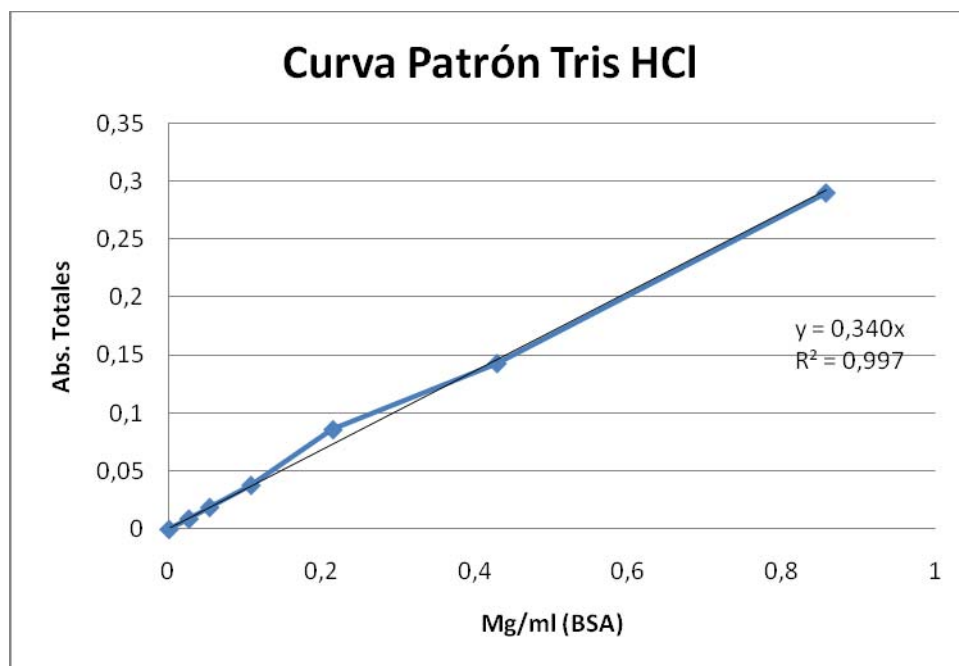
mg/mL BSA	Abs. Obtenidas H <sub>2</sub> O	Abs. totales
0	0,401	0
0,0063	0,406	0,005
0,05	0,415	0,014
0,101	0,421	0,02
0,203	0,442	0,041
0,406	0,484	0,083
0,8125	0,568	0,167



**Grafico 1. Curva patrón BSA diluido en agua desionizada**

**Tabla 2. Curva patrón con Suero de Albumina Bovina (BSA) resuspendido en Buffer Tris HCl (pH 7.032)**

<b>mg/mL BSA</b>	<b>Abs. Obtenidas Tris HCl</b>	<b>Abs Totales</b>
0	0,417	0
0,026	0,426	0,009
0,053	0,436	0,019
0,107	0,455	0,038
0,214	0,503	0,086
0,428	0,560	0,143
0,857	0,707	0,29



**Gráfico 2. Curva patrón BSA diluido en Buffer Tris HCl (pH 7.032)**

Los puntos en las curvas patrón de los gráficos 1 y 2 indican el promedio de los duplicados realizados a cada una de las concentraciones de suero de albumina bovina (BSA), correspondientes a las Tablas 1 y 2, resuspendiendo las concentraciones de BSA en los respectivos solventes (agua desionizada y Tris HCl).

Las curvas patrón presentaron un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.998 grafica 1 y 0.997 grafica 2 que revelan una correlación superior al 99% conforme a la ley de Lambert Beer, exhibiendo una relación directamente proporcional entre el color y las concentraciones seleccionadas de proteína dando como resultado la ecuación de la recta.

**Tabla 3. Concentración de proteínas en mg/mL de la fracción proteica extraída con agua**

<b>% saturación</b>	<b>Abs. agua 1/5</b>	<b>mg/mL</b>
20	0,096	0,468
40	0,082	0,400
50	0,057	0,278
60	0,073	0,356
80	0,061	0,298
90	0,05	0,244

La tabla 3 presenta las diferentes concentraciones en mg/mL de proteína precipitada a los distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio. Estas concentraciones fueron obtenidas a partir de la ecuación de la recta proporcionada por la curva patrón (grafica 1), reemplazando los valores de absorbancia generados para cada porcentaje de saturación, en el extracto proteico a partir de agua. Estos ensayos se hicieron por duplicado para cada muestra. En esta tabla se evidencia que el mejor porcentaje de saturación, que permite una mayor cantidad de proteínas para el extracto en agua, es del 20%, con una concentración proteica de 0.468 mg/mL, dicha concentración se resalta en color azul en la tabla. Este resultado confirma lo previsto con la prueba cualitativa de la figura 4.

**Tabla 4. Concentración proteica en mg/mL de la fracción proteica extraída con Tris HCl pH 7.032.**

<b>% saturación</b>	<b>Abs. Tris HCl 1/5</b>	<b>mg/mL</b>
20	0,062	0,182
40	0,054	0,159
50	0,378	1,112
60	0,276	0,812
80	0,388	1,141
90	0,289	0,85

En la tabla 4 se exhiben las absorbancias promedio del extracto proteico en Buffer Tris HCl, obtenidas de los diferentes porcentajes de sulfato de amonio, por el ensayo en microplaca de Bradford. Éstas se reemplazaron en la curva patrón (grafico 2), revelando las concentraciones en mg/mL de proteína. En la tabla se resalta con amarillo que la precipitación con sulfato de amonio al 80% generó una mayor concentración de proteínas, de 1.141 mg/mL para éste extracto. Se reafirmó con esta prueba cuantitativa lo discutido anteriormente en la figura 5 prueba cualitativa.

Como se puede observar, los datos cuantitativos en el proceso de obtención de extractos acuosos proteicos determinan, que de los dos agentes extractores utilizados en éste estudio, el mejor extractor fue el Buffer Tris HCl (pH 7). Adicionalmente, el porcentaje de saturación más adecuado para la extracción de proteínas fue del 80%, debido a que se alcanzó una concentración de proteína precipitada estimable.

La concentración de proteínas precipitadas con sulfato de amonio, nos devela un proceso bastante eficiente. Pues al no existir una cantidad considerable de concentración de proteína encontrada en el sobrenadante. Por lo tanto se pone de manifiesto que esta técnica es confiable y segura para la recuperación de proteínas en los extractos acuosos.

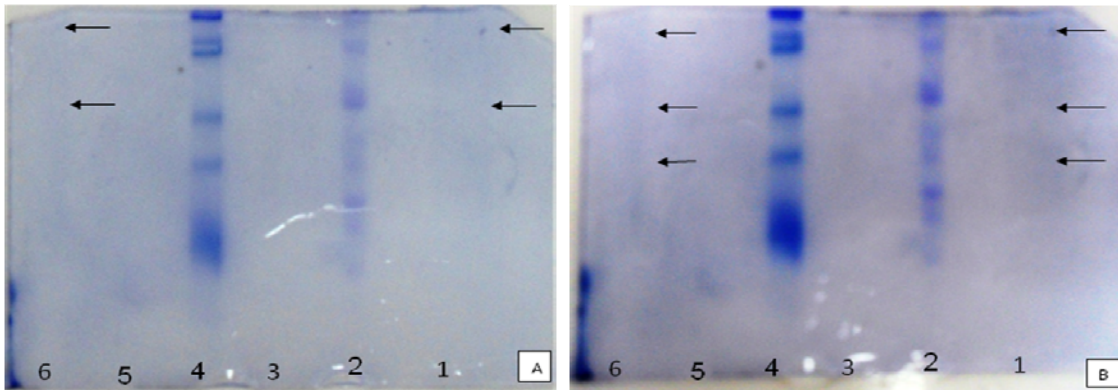
La técnica de Bradford es la más apropiada para identificar la concentración de proteínas por su sensibilidad, ésta puede detectar un rango de concentración proteica de 25 a 200 µg/mL. Esto se debe al acoplamiento que tiene el colorante con la proteína y se determina colorimétricamente a 480 nm. Existe una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas.(Ahmed 2000).

Siguiendo con la trayectoria del trabajo de grado en esta etapa, se realizó la electroforesis que permitió la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular frente a los patrones de peso, para cada uno de los extractos y su posterior comparación. Esta técnica ofrece ventajas como el bajo costo y su reproducibilidad.

Las muestras fueron desnaturalizadas por calor en presencia de agentes desnaturalizantes como el beta-mercaptoetanol, que rompe los puentes disulfuro y SDS que desnaturaliza las proteínas, dándoles una carga neta negativa proporcional a su masa.

Se prepararon geles al 12% que corresponde al porcentaje T, el cual indica el tamaño del entrecruzamiento entre la acrilamida y la bisacrilamida. Este porcentaje permite visualizar un amplio rango de proteínas, entre 10 a 200 kilo Dalton, lo que quiere decir que a un menor porcentaje de T, mayor es el tamaño del poro, permitiendo visualizar proteínas de alto peso y que a un porcentaje T menor, el tamaño del poro es mayor, permitiendo separar proteínas de bajo peso molecular.<sup>2</sup>

<sup>2</sup>. <http://webpages.ull.es/users/acasti/docencia/practicas/9.pdf>

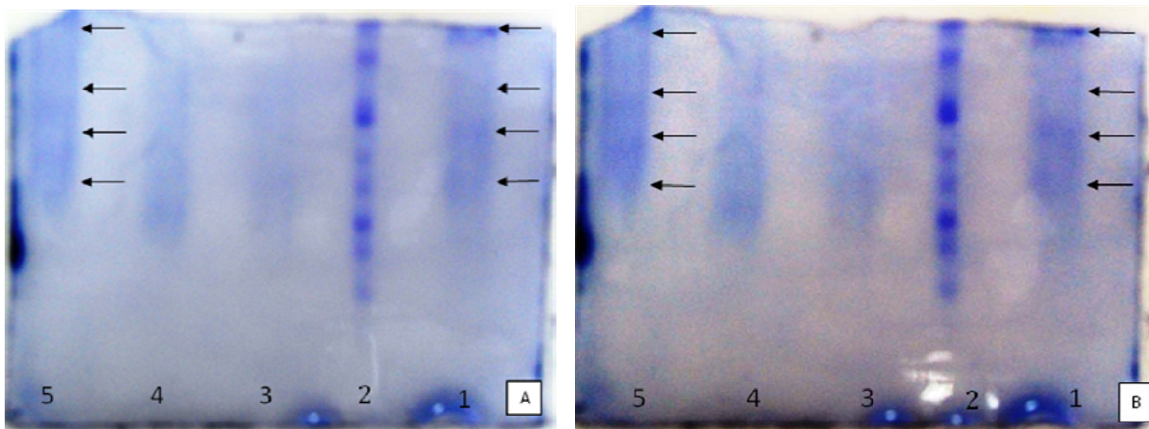


**Figura 8. Electroforesis del extracto proteico en agua**

1. Extracto proteico concentrado
2. Patrón de peso molecular
3. Extracto proteico dilución 1/5
4. Patrón de peso molecular
5. Extracto proteico dilución 1/10
6. Extracto proteico concentrado

La figura 8 A y B son réplicas de la muestra proteica extraída en agua a diferentes concentraciones. La figura 8 A presenta una serie de bandas no muy bien definidas por lo tanto, se decidió realizar una segunda prueba. Figura 8 B donde se confirmó lo visto en la primera réplica.

En la figura 8 B se señalaron con flechas los carriles 1 y 6, donde se encuentran las muestras de mayor concentración y se distingue una tendencia de formación de bandas que no se definen claramente. Estos resultados podrían corresponder a la concentración de sal en las muestras del extracto de agua, que no permite una definición de las bandas, sino por el contrario, un ensanchamiento y desvanecimiento de éstas sin una tendencia compacta. Se ratifican los resultados obtenidos tanto cuantitativos como cualitativos durante el estudio.



**Figura 9. Electroforesis del extracto acuoso proteico en Tris HCl**

1. Extracto proteico concentrado
2. Patrón de peso molecular
3. Extracto proteico dilución 1/5
4. Extracto proteico dilución 1/10
5. Extracto proteico concentrado

Las figuras 9 A y B se realizaron paralelamente con las anteriores figuras. Son réplicas confirmativas que pretendieron demostrar la presencia de proteína. En estas figuras ya se evidencia de manera más clara la formación de bandas, tanto en el extracto proteico concentrado como en sus diluciones 1/5 y 1/10. Para la discusión se tomaron como referencia los carriles 1 y 5, donde se encuentra la muestra concentrada y las bandas se ven con mayor claridad.

Se establece que el extracto proteico de las hojas de *Pentacalia nitida* extraídas con Buffer Tris HCl, revela una mayor cantidad de este metabolito primario que, al ser comparada con el marcador de peso molecular, permite inferir la presencia de un amplio rango de proteínas, que van desde un bajo hasta un alto peso molecular.

Este método permite evaluar la pureza de la proteína. Cuando dicha pureza no es la apropiada, tiene un efecto adverso en la formación de bandas. Se presume que las concentraciones de sulfato de amonio lograron generar interferencia en la electroforesis u ocasionar una modificación en la proteína, lo que impide su detección fácilmente. (Scopes 1994; Ahmed 2000)

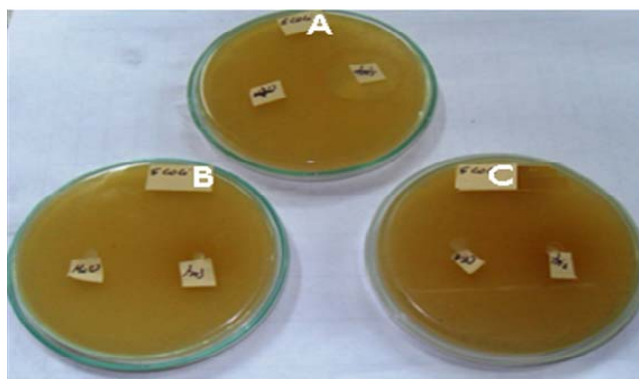
Por lo tanto se recomienda el uso de la diálisis para eliminar la acumulación de sulfato de amonio ya que este es un interferente bastante fuerte en las diferentes etapas del proceso de cuantificación y detección de proteínas.

Tras identificar la presencia de proteínas en los extractos, se continuó con la obtención de las cepas bacterianas para establecer el potencial de inhibición de los extractos proteicos. Las cepas bacterianas inicialmente fueron reactivadas en agar y caldo nutritivo. Se conservaron a temperatura óptima de crecimiento para cada microorganismo, siendo de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Se realizó la técnica de pozos en agar Mueller Hinton, que es utilizada para ensayos de resistencia en agentes patógenos, frente a antibióticos o sustancias inhibitorias. (Merck, 1994).

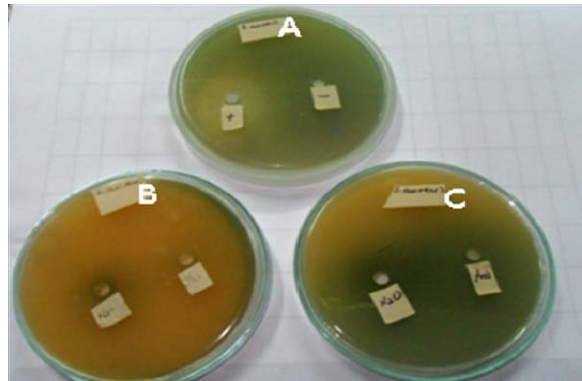
La técnica de pozos se basa en colocar la sustancia de interés dentro de los pozos que se hicieron en el agar, como control positivo se tomó el antibiótico de amplio espectro cloranfenicol, que inhibe todos los microorganismos escogidos para este estudio, microorganismos que tienen alto impacto en la industria de alimento causando enfermedades a los consumidores.

### ***Escherichia coli***



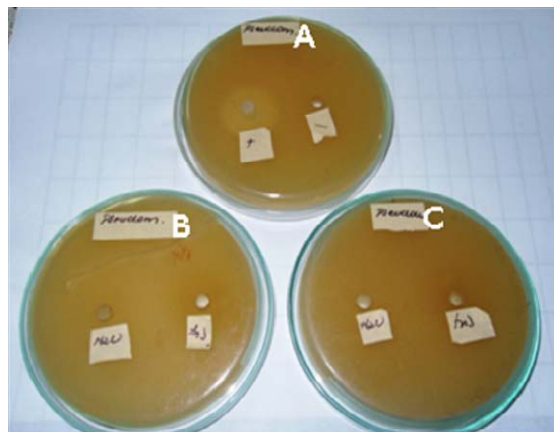
**FIGURA 10 A. control positivo con cloranfenicol y control negativo, B y C duplicado de los extractos proteicos obtenidos de los solventes Tris HCL y Agua desionizada frente a la cepa *E. coli* (Quintín 2010)**

***Staphylococcus aureus***



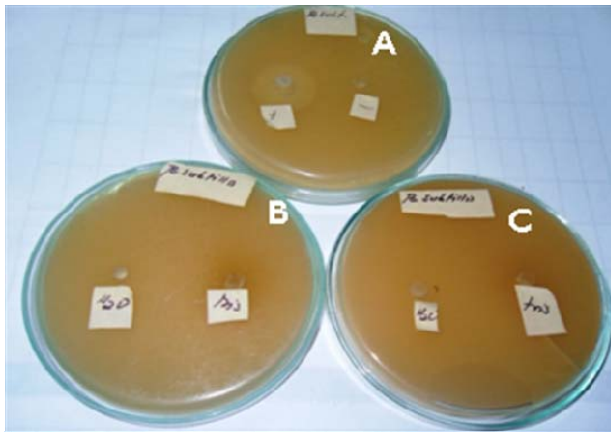
**FIGURA 11 A. control positivo con cloranfenicol y control negativo, B y C duplicado de los extractos proteicos obtenidos de los solventes Tris HCL y Agua desionizada frente a la cepa *S. aureus* (Quintin 2010)**

***Pseudomona sp.***



**FIGURA 12 A. control positivo con cloranfenicol y control negativo, B y C duplicado de los extractos proteicos obtenidos de los solventes Tris HCL y Agua desionizada frente a la cepa *Pseudomona sp.* (Quintin 2010)**

## ***Bacillus subtilis***



**FIGURA N° 13 A. control positivo con cloranfenicol y control negativo, B y C duplicado de los extractos proteicos obtenidos de los solventes Tris HCL y Agua desionizada frente a la cepa *B. subtilis* (Quintín 2010)**

Las pruebas microbiológicas realizadas con las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona sp.* y *Bacillus Subtilis*, fueron negativas debido a que las proteínas obtenidas no presentaron actividad antibacteriana (figura 10, 11, 12, y 13). La resistencia de las bacterias al carácter inhibitorio de las proteínas extraídas de las hojas de *Pentacalia nitida*, podría estar relacionada con la complejidad de la envoltura celular de estas bacterias, la cual es de naturaleza altamente lipofílica, característica que dificulta el paso de las moléculas al interior de las células bacterianas.

Los bacilos *Gram* negativos como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* poseen una pared celular compuesta peptidoglicano, una capa adicional de liposacáridos y una segunda bicapa lipídica que contiene polisacáridos y proteínas. La membrana externa de las bacterias *Gram* negativas tiene propiedades excepcionales de impermeabilidad, además posee proteínas denominada **porinas**, que actúan como canales de entrada y salida de sustancias hidrofílicas de bajo peso, convirtiéndolas en bacterias con alta resistencia al poder bactericida (Doyle, 1997).

*Staphylococcus aureus*, coco Gram positivo y *Bacillus subtilis*, bacilo Gram positivo, generan mecanismos de protección mediante su pared celular que está formada por un 50% de mureína de su peso seco y ácidos teicoicos. (Doyle, 1997).

Es probable, que el efecto antagónico no se presentara, debido a que las concentraciones proteicas utilizadas no fueron las más adecuadas para la inhibición de las bacterias. En segundo lugar, las altas concentraciones de sulfato de amonio no hayan permitido que las proteínas entraran en contacto con la pared celular para causar la lisis de ésta. Es posible que las proteínas inhibitorias se modificaran con el tratamiento de extracción y precipitación que se realizó en este trabajo.

Estudios sobre la participación de proteínas de defensa demuestran que actúan inhibiendo el desarrollo de microorganismos en la planta huésped. (Álvarez et al 2003; Carvalho et al 2000; Saska et al 2008). En este estudio es verosímil que las proteínas de defensa se expresen en condiciones de estrés.

Estos resultados no concuerdan con los reportados por Tobo (2009), quien señaló en su trabajo de grado que los extractos proteicos si tenían actividad antimicrobiana con cepas diferentes a las expuestas en este trabajo, con respecto a esto, es importante señalar que este autor utilizó diferentes cepas (*Samonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas fluorescens*), diferentes porcentajes de saturación con sulfato de amonio y realizó el estudio microbiológico con prueba del antibiograma en agar tripticasa soya.

Otros factores que pudieron influir son: la fuente botánica, la época de recolección, la etapa de desarrollo, la técnica de extracción, el tratamiento de la planta seca, y por último la metodología utilizada en las pruebas, pueden afectar la susceptibilidad bacteriana (Vuorelaa et al. 2004). Por todo lo anterior los resultados de estos estudios no se pueden generalizar a otras bacterias y a otras especies vegetales.

## 8. CONCLUSIONES

Se extrajo la fracción apolar con solventes de baja polaridad (bencina de petróleo y diclorometano).

Se obtuvieron los extractos protéicos (polares) utilizando los solventes agua y buffer Tris HCl, a partir de hojas de *Pentacalia nítida* perteneciente a la familia *Asteraceae*.

Se determinó la concentración de sulfato amonio adecuada para cada extracto proteico. donde el mejor agente extractor de proteínas fue el Buffer Tris HCl, con un porcentaje de saturación del 80% y una concentración proteica de 1.141 mg/mL

Se compararon los corridos electroforéticos de los extractos proteicos obtenidos a partir de agua y Buffer Tris HCl. Donde en el Buffer exhibe una mayor formación de bandas claras y definidas de un amplio rango de proteínas de bajo y alto peso molecular.

No se obtuvieron halos de inhibición en las pruebas microbiológicas, debido a posibles interferentes, como las altas concentraciones de sulfato de amonio.

No se pudo determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de *Pentacalia nítida* debido a que no se presentó actividad antimicrobiana.

La pared celular de las bacterias estudiadas generó resistencia a los extractos protéicos obtenidos.

Es posible que la planta *Pentacalia nítida* necesite condiciones extremas o de estrés para expresar proteínas que tengan función antagónica.

### 8.1 RECOMENDACIONES

Para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos, se recomienda usar compuestos con tiol, tales como el  $\beta$ - mercapto etanol, que minimiza la acción de la enzima fenol oxidasa (Scopes.1994). La adición de polivinilpirrónico es frecuentemente utilizada ya que absorbe los compuestos fenólicos". (Scopes 1994).

Para eliminar el exceso de sales, se recomienda el uso de la diálisis o la ultracentrifugación, a fin de eliminar la acumulación de sulfato de amonio, pues éste es un interferente bastante fuerte en las diferentes etapas del proceso de cuantificación y detección de proteínas.

Para identificar una mínima cantidad de proteínas en los geles de electroforesis, se recomienda teñirlo con plata, ya que esta tinción permite detectar hasta 2.0 ng de proteína en una sola banda.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

AHMED H., 2000. Principles and reaction of protein extraction, purification and characterization Londres. 5-31; 35-68; 97-129.

ALLEN T, MARK W. 2004. Desalting, Concentration, and Buffer Exchange by dialysis and ultrafiltration. Current protocols in protein science 4.4.1-4.4.15. John Wiley & Sons Inc, New York,USA.

ALVAREZ PIZARROL J. C., MONTEGHIRFO M., 2003. Aislamiento de una fracción proteica de bajo peso molecular de semillas de Maca (*Lepidium peruvianum* G. Chacón) con propiedades antifúngicas. Rev soc: Química Perú.69 N° 4: 222 – 228

BOLLAG M., EDELSTEIN S., ROZYCKI M. 1996. Protein methods segunda edición New York.

BOTERO OSPINA. MARÍA JOSÉ., ARANZAZU HERNÁNDEZ. FABIO.1999. Estudios biológicos y epidemiológicos de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en tomate de árbol y desarrollo de alternativas para su manejo integrado en Colombia. Corpoica regional 9. Manizales, Caldas:1-58

BROEKAERT W., FRANKY R., CAMMUE P., OSBORN R., 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system, plant physiol 108: 1353 – 1358.

CAMMUE B., DE BOLLE M., TERRAS F., PROOST P., REES S.1991. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds

CARVALHO A., LIMA O., CUNHA M., SANTOS I., GOMES V., 2000. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seds. Editions scientifiques et médicales. Elsevier. 39: 137-146.

CORTES D., ESCOBAR M. 2001. Evaluación del efecto antifúngico de sustancias obtenidas a partir de *Pentacalia corybosa* (Benth) Cuatr (GUASGÜIN) frente a *Botrytis cinérea* aislado de un cultivo de clavel. Microbiología Pontificia Universidad Javeriana.

COSTA L., GOMEZ S., MOLINA C., SIMPSON., ROMERO M. 2002. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. Universidad Austral de Chile. Valparisco. Chile 52(2):160-166

CUATRECASAS J. 1969. Primera Flora Colombiana. Vol 3. Editorial improta S.A pp 90-194

DIAZ J. 1998. Aproximación proteómica al estudio de podredumbre apical 1-44

DOYLE M., BEUCHAT L., MONTVILLE T. 1997. Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras. Zaragoza España. 131-142; 343-354; 371-378.

GARCIA BARRIGA, H. 1975. Flora Medicinal de Colombia. Vol 2. Editorial Imprenta Nacional. Bogotá D.C. Colombia. pp 293 – 398 – 409

HARRIS, E LV., ANGAL, S. 1994. Protein purification methods a practical approach. Oxford University Press. 317

KALEMBA, D., KUNICKA, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils .*Current Medical Chemistry*. Poland, 10 pág. 813-829.

LARRAHONDO A, JESUS. E. 2001. Evaluaciones químicas preliminares de productos naturales. Catorse SCS

LIZCANO R., VERGARA J. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes thopalooides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de grado. Bogotá D.C. págs. 32-36

MERCK. 1994 MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO

McCOWN B., BECK G., HALL T., 1967. Plant leaf and stem proteins. I. Extraction and Electrophoretic separation of the basic, water –soluble fraction. College of Agriculture, University Wisconsin: 578- 585.

MÉNDEZ D. 2000, Química y actividad antifúngica de *Pentacalia corymbosa* (Asteraceae-Senecioneae). *Rev Latinoamer Quím.*;28: 31-34.

PAXTON J 1991. Assays for Antifungal Activity. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 6. Assays for Bioactivity. Hostettmann, K. (Ed). Academic Press. London, England. pp. 33-46.

PEDROZO J. A., TORRENEGRA R. D., TÉLLEZ A. N., GRANADOS A. 2006; New source of quinols, the surface of *Pentacalia ledifolia* and *Pentacalia corymbosa* leaves and its antifungal activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (Supl.): 591-595.

PEDROZO J., 2001 Química y propiedades antimicrobianas de plantas autóctonas de paramos Colombianos. Tesis para el título de doctorado en Ciencias Biológicas.

PEÑARANDA L., SIERRA M., 2003. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de las especies *Bursera Simaruba* y *Bursera graveolens* contra algunos microorganismos patógenos. Microbiología Pontificia Universidad Javeriana.

PRESCOTT LANSING. M. 2004. Microbiology. Edición 6ª McGraw-Hill interamericana.

QUINTÍN P. 2010 extracción de la fracción proteica utilizando dos solventes (agua y tris HCl) y determinación de la actividad antimicrobiana a los extractos sobre las cepas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus aureus* – a partir de hojas de *Pentacalia nítida* (Fam. Asteraceae. Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana.

ROMERO H. 2008. Estudio químico comparativo de dos especies provenientes de páramo de los géneros *Pentacalia* y *Diplostephium*. Biología Pontificia Universidad Javeriana

SASKA I., COLGRAVE M., JONES A., ANDERSON M., Y CRAIK D., Quantitative analysis of backbone cyclic peptides in plants. 2008 *Journal*, 872: 107 -114.

SCOPES R., 1994 Protein purification principles and practice tercera edición Australia: 3-17; 22 - 38; 71-100

TOBO J., 2009 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *Pentacalia ledifolia* y *Pentacalia vaccinioides* (Fam. Asteraceae) SOBRE CEPAS DE *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella Typhimurium*. Microbiología Grupo de Fitoquímica Universidad Javeriana. Trabajo de grado.

TORRENEGRA R. D., PEDROZOJ.A., TELLEZ A.N., CABEZA G, GRANADOS A., MENDEZ D. 2000. Química y actividad antifúngica de *Pentacalia corymbosa* (Asteraceae-Senecioneae). Investigación fitoquímica. Universidad Javeriana. Departamento de química. Bogotá .D.C.

VÁSQUEZ G. 2003. La contaminación de los alimentos, un problema por resolver. Salud UIS.(35):48-57.

VUORELAA P., LEINONENB M. 2004. Natural products in the process of finding new drug candidates. Curr Med Chem 11: 1375 -1389.

WALKER J., 2002. The protein protocols hand book, human press. Edición 2ª. New Jersey

YÁBAR VILLANUEVA. FREDY EMILIO.2005. Química general. Universidad Nacional central del Perú. Facultad de ingeniería en industrias alimentarias. Huancayo: 1-9