



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

**“ANÁLISIS DEL EXTRACTO PROTEICO DE *BROMELIA PINGUIN* CON
POSIBLE APLICACIÓN TERAPÉUTICA Y/O BIOTECNOLÓGICA”**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:
LIGIA GUADALUPE BRITO ARGAEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO
4 DE NOVIEMBRE DE 2011**



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
OFICIO N° X.379/2011

MÉRIDA, YUCATÁN A 25 DE OCTUBRE DE 2011

ASUNTO: SE AUTORIZA IMPRESIÓN

C. BRITO ARGÁEZ LIGIA GUADALUPE
PASANTE DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.
P R E S E N T E.

De acuerdo al fallo emitido por su asesor DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ y la comisión revisora integrada por Dr. Luis Fernando Cuevas Glory, el Dr. Gabriel Lizama Uc y el Dr. Víctor Manuel Toledo López, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la **TESIS:**

"ANÁLISIS DEL EXTRACTO PROTEICO DE *BROMELIA PINGUIN* CON POSIBLE APLICACIÓN TERAPÉUTICA Y/O BIOTECNOLÓGICA"

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

M.C RAMIRO ALPIZAR CARRILLO.
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

CMU/RAC/ljaa



Km.5 Carretera Antigua Mérida-Progreso S/N A.P. 911 C.P. 97118
Mérida, Yucatán, México
Tels. 944-81-04, 944-81-13, 944-81-22 Fax: 944-81-81
e-mail: itm@itmerida.mx <http://www.itmerida.mx>



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez por haber dirigido este trabajo y por el tiempo dedicado en las revisiones y sus valiosas aportaciones en la elaboración de este trabajo de tesis.

Al Dr. Oscar Moreno Valenzuela, Dr. José Juan Zúñiga Aguilar y Dr. Ignacio Islas Flores por haberme brindado su apoyo y la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Dr. Gabriel Lizama Uc por su apoyo en la revisión del trabajo y sus valiosas aportaciones en los tutoriales que ayudaron a enriquecer mi trabajo.

Al Dr. Luis Cuevas Glory por su apoyo en la parte de edición del trabajo.

Al Dr. Víctor Toledo López por su apoyo en la revisión del trabajo.

A los integrantes del laboratorio de Microbiología Aplicada y Molecular del Instituto Tecnológico de Mérida por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

Al CICY por el apoyo y la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin Trifosfato
BHK-21	Línea celular (Baby-Hamster-Kidney)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
HCN	Ácido Cianhídrico
HeLa	Línea celular (Células humanas inmortales)
kDa	Kilo Daltones
LPT	Lipopolisacárido
LTP	Proteínas de Transferencia de Lípidos
NADH	Nicotinamida Adenina dinucleótido
Pa-AFP	Péptido antifúngico (<i>phytolacca americana</i>).
PAM	Péptidos Antimicrobianos
PPP	Proteína Parcialmente Purificada
PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE

RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Inmunidad innata en plantas	3
2.2.1 Barreras morfológicas de las plantas	3
2.2.2 Metabolitos secundarios	4
2.2.2.1 Características generales de los metabolitos secundarios.....	4
2.2.3 Metabolitos secundarios con acción antimicrobiana aislados de plantas	5
2.2.3.1 Fenoles y heterósidos fenólicos (Compuestos fenólicos simples)....	6
2.2.3.2 Quinonas	6
2.2.3.3 Taninos	7
2.2.3.4 Cumarinas	7
2.2.3.5 Flavonas y compuestos relacionados	7
2.2.3.6 Alcaloides	8
2.2.4 Péptidos antimicrobianos (PAM)	8
2.2.4.1 Clasificación	9
2.2.4.2 Mecanismos de acción	10
2.2.4.3 Mecanismos intracelulares de los PAM	12
2.2.5 Péptidos antimicrobianos de plantas.....	13

2.2.5.1	Proteínas de transferencia de lípidos.....	14
2.2.5.2	Tioninas.....	15
2.2.5.3	Defensinas	15
2.2.5.4	Péptidos de unión a quitina	16
2.2.5.5	Ciclótidos.....	17
2.3	Inmunidad inducida en las plantas	17
2.3.1	Proteínas PR (Pathogenesis Related Proteins)	17
2.3.1.1	Descubrimiento y definición	18
2.3.1.2	Distribución y localización.....	19
2.3.1.3	Clasificación	19
2.4	Bromeliaceae	21
2.4.1	Clasificación	21
2.5	<i>Bromelia pinguin</i>	22
2.5.1	Descripción.....	22
2.5.2	Reproducción	23
2.5.3	Hábitat	23
2.5.4	Usos de <i>B. pinguin</i>	23
3.	ANTECEDENTES	25
3.1	Estudios realizados en <i>B. pinguin</i>	25
4.	OBJETIVOS	29
	OBJETIVO GENERAL	29

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Material biológico	30
5.2 Extracción de proteína	30
5.3 Determinación de concentración de proteína	30
5.4 Métodos electroforéticos	31
5.5 Ensayo de biografía en gel	31
5.6 Determinación de actividad proteolítica sobre gel	32
5.7 Actividad antimicrobiana	32
5.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	33
5.9 Purificación por cromatografía de filtración en gel.....	33
5.10 Concentración en unidades de filtración por tamaño de corte.....	33
5.11 Determinación de actividad hemolítica.....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1 Determinación del amortiguador adecuado para la extracción de las proteínas totales contenidas en frutos y semillas de <i>B. pinguin</i>	35
6.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos sobre bacterias patógenas.....	38
6.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto soluble sobre bacterias patógenas.....	42

6.4 Purificación parcial y concentración de la(s) proteínas con posible actividad antimicrobiana, mediante columnas de filtración en gel y unidades de centrifugación con membranas de tamaño de corte de 3 KDa.	45
6.5 Determinación del tamaño molecular de la(s) proteínas con posible actividad antimicrobiana, mediante ensayos de autobiografía en geles de poliacrilamida.	49
6.6 Evaluación de la toxicidad de los extractos de <i>B. pinguin</i> , mediante ensayos de actividad hemolítica sobre glóbulos rojos humanos.	53
7. CONCLUSIONES	55
8. BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos en células microbianas.	11
Figura 2. Perfil proteico de extractos de frutos de <i>B. pinguin</i> . SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata (A) y teñido con azul de Coomassie (B),	35
Figura 3. Perfil proteico de extractos de semillas de <i>B. pinguin</i> . SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida teñido con nitrato de plata.	37
Figura 4. Ensayo de la actividad antimicrobiana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (A), <i>Escherichia coli</i> ATCC 35922 (B), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (C) del extracto proteico total del fruto y semilla de <i>B. pinguin</i>	38
Figura 5. Ensayo de la actividad antimicrobiana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (A), <i>Escherichia Coli</i> ATCC 35922 (B), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (C) del extracto proteico del fruto de <i>B. pinguin</i>	40
Figura 6. Perfil proteico de los extractos total, soluble y membranal del fruto de <i>B. pinguin</i> . SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (A) y nitrato de plata (B).....	41
Figura 7. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto soluble de fruto de <i>B. pinguin</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 35922.	42
Figura 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto soluble de fruto de <i>B. pinguin</i> sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25923.	43
Figura 9. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto soluble de fruto de <i>B. pinguin</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	44
Figura 10. Cromatograma del extracto soluble en una columna conteniendo resina Sephadex G-25.....	45

Figura 11. Perfil proteico del extracto soluble después de ser fraccionado en una columna conteniendo resina Sephadex G-25.....	46
Figura 12. Ensayo de la actividad antimicrobiana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (A) y perfil proteico (B) del extracto soluble posterior a la aplicación en un Amicon de tamaño de corte de 3 kDa.	48
Figura 13. Perfil proteico (A), ensayo de autobiografía sobre gel de la actividad antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (B) y actividad proteolítica (C) de extractos de <i>B. pinguin</i> posterior a la aplicación en un Amicon con tamaño de corte de 3kDa y 30 kDa.	50
Figura 14. Ensayo de la actividad hemolítica del extracto soluble posterior a la aplicación en un Amicon con tamaño de corte de 3 kDa sobre glóbulos rojos humanos.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas	6
Tabla 2. Clasificación de los péptidos antimicrobianos basada en los aminoácidos que los componen, la carga neta y la estructura secundaria	9
Tabla 3. Péptidos antimicrobianos de plantas	14
Tabla 4. Clasificación de las familias de proteínas PR	20
Tabla 5. Actividad antimicrobiana del extracto soluble después de ser fraccionada en una columna conteniendo Sephadex G-25 sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	47

RESUMEN

La situación actual de resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos convencionales es un serio problema a nivel mundial. En México, las infecciones por bacterias es una de las principales causas de muerte, así como los desórdenes gastrointestinales son las enfermedades más comunes, principalmente se ha registrado resistencia, en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de fármacos más eficaces y cuyos mecanismos de acción no sean fácilmente destruidos por los microorganismos. Las plantas constituyen una de las principales fuentes para la búsqueda de nuevos fármacos, de las cuales se han aislado muchos compuestos, tales como metabolitos secundarios y proteínas que tienen actividad antimicrobiana y pueden ser usados contra una gran variedad de bacterias patógenas. Los péptidos antimicrobianos han surgido en los últimos 25 años como una familia de sustancias con gran potencial para uso clínico, debido a sus múltiples mecanismos de acción, amplio espectro de acción y bajo potencial de resistencia.

Bromelia pinguin L. es una planta nativa de Yucatán, México; su fruto es usado como alimento, así como agente terapéutico por poseer propiedades medicinales. En el presente trabajo se realizaron extracciones en medio acuoso de frutos y semillas de *Bromelia pinguin*, dirigido a la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas ATCC (*Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* 27853). Los extractos de frutos presentan inhibición contra todas las bacterias ensayadas, principalmente la fracción soluble, presentando valores de CMI de (0.492-.984 mg/ml), adicionalmente se encontró que esta actividad está dada tanto por compuestos \geq a 3 kDa como por compuestos $<$ a 3 kDa. Se demostró que un grupo de proteínas de peso molecular alto (~200 kDa) parecen contribuir a esta actividad y que además presentan actividad proteolítica. Se evaluó la actividad hemolítica de los extractos proteicos con actividad antimicrobiana sobre glóbulos rojos humanos y se encontró que tienen menos del 2% de esta actividad, teniendo como referencia

que lo permisible para considerar que un compuesto con actividad biológica sea inocuo sea inferior al 10% de actividad hemolítica.

ABSTRACT

The present situation of resistance against pathogens by conventional antibiotics is a serious problem worldwide. In Mexico, bacterial infections is one of the leading causes of death, and gastrointestinal disorders are the most common diseases, especially there has been resistance in strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, it is necessary to find more effective drugs whose mechanisms of action are not easily destroyed by microorganisms. The plants are a major source for finding new drugs, which have been isolated many compounds, such as proteins and secondary metabolites that have antimicrobial activity and can be used against a wide variety of pathogenic bacteria. Antimicrobial peptides have emerged in the last 25 years as a family of substances with great potential for clinical use due to their multiple mechanisms of action, broad spectrum and low potential for resistance.

Bromelia pinguin L. is a plant native of Yucatan, Mexico, and its fruit is used as food, as well as a therapeutic agent to possess medicinal properties. In the present work aqueous extraction of fruits and seeds of *Bromelia pinguin* were done to the search for compounds with antimicrobial activity against pathogenic bacteria ATCC (*Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* 27853). Fruit extracts exhibit inhibition against all bacteria tested, mainly the soluble fraction, showing MIC values (0.492-984 mg / ml); additionally, it was found that this activity is given by both ≥ 3 -kDa compounds as < 3 kDa compounds. It was shown that a group of high molecular weight proteins (~ 200 kDa) appear to contribute to this activity and also show proteolytic activity. We evaluated the hemolytic activity of the protein extracts with antimicrobial activity on human red blood cells and found to have less than 2% of this activity, with reference to what is permissible to consider that a compound with biological activity is innocuous when its hemolytic activity is less than 10%.

1. INTRODUCCIÓN

Las *bromeliáceas* son plantas nativas de América Tropical, incluyendo desde la costa del Pacífico, México hasta Brasil. México cuenta con muchas especies de bromelias, la mejor conocida es la piña. La mayor parte de esta familia son ornamentales por presentar flores de colores brillantes de larga duración al igual que su follaje. En muchas zonas de México se presentan de manera endémica tal es el caso de *Bromelia pinguin* una planta conocida como piñuela o *ch'om* en maya.

La planta de la piñuela se utiliza principalmente como cerco vivo, para el control de la erosión; el fruto y la flor se utilizan principalmente para el consumo humano, la porción fibrosa de las hojas se utilizaba en la cordelería, así como el parénquima para alimento de ganado (Lamfi, 1976). Pero su principal cualidad se basa en las propiedades medicinales descritas para esta planta tales como: vermífugo (contra parásitos intestinales), diurético y antirreumático (Escobar, 1980); así como fuente de compuestos de interés comercial como son los esteroides y las proteasas (Abreu-Payrol y Miranda, 2000).

Existen pocos estudios respecto a los compuestos bioactivos presentes en la piñuela, sobre todo en tres líneas: (1) búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana, antifúngica y anticancerígena en frutos, hojas, tallo y raíces (Raffaut *et al.*, 1981), (2) caracterización de la pinguinaína y otras proteasas presentes en el fruto (Toro-Goyco *et al.*, 1968), (3) así como estudios farmacognósticos y bromatológicos de frutos de *B. pinguin* (Abreu-Payrol y Miranda, 2000).

Todos estos estudios se han realizado en extractos etéreos obtenidos a partir de disolventes orgánicos. El primero de ellos encaminado a estudiar compuestos del metabolismo secundarios tales como terpenos y flavonoides. El segundo básicamente dirigidos exclusivamente a la caracterización de la pinguinaína, la enzima más abundante en los frutos de *B. pinguin*, y el tercero dirigidos para estudiar los componentes fitoquímicos y bromatológicos generales presentes en esta planta.

En la actualidad la tendencia a consumir más productos de origen natural, y el difícil acceso a los medicamentos en muchas regiones del mundo ha llevado a la población mundial a buscar otras alternativas para aliviar sus dolencias. La medicina ancestral derivada de plantas ha sido una de las alternativas más utilizadas para encontrar compuestos que ayuden a los diferentes malestares. Uno de los compuestos de gran interés en la industria farmacéutica, es el caso de las proteínas o péptidos con actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos patógenos, tales como bacterias, hongos y virus. Una ventaja fundamental para este tipo de compuestos es que los péptidos antimicrobianos parecen no generar resistencia en los organismos sobre los cuales se aplican (Zasloff, 2002; Brodgen, 2005), un efecto colateral que generalmente se observa en cepas de microorganismos patogénicos, después de que estas son sometidas a las frecuentes aplicaciones de antibióticos.

Con base en lo anterior en este trabajo se propone la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana de extractos proteicos de frutos y semillas de *B. pinguin* contra bacterias patógenas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

Las plantas y los animales han logrado sobrevivir en coexistencia con microorganismos, muchos de ellos potencialmente patógenos, siendo sorprendente el índice de sobrevivencia logrado gracias a las diversas estrategias de defensa desarrolladas. Estas estrategias incluyen la llamada inmunidad innata y una forma más evolucionada conocida como inmunidad adquirida. Investigaciones recientes han demostrado la existencia, tanto en el reino animal como en el vegetal, de la inmunidad innata o inmediata (Boman, 1996; 2000). En este mecanismo participan moléculas que son las primeras en reconocer e intentar la destrucción de las partículas extrañas y que muestran especificidad hacia componentes de la pared celular microbiana como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram⁻, glicolípidos de micobacterias, el ácido lipoteicoico de bacterias Gram⁺, β-glucanos de levaduras y dobles cadenas de RNA virales, entre otros (Boman, 2000; Hoffmann *et al.*, 1999). Entre los mecanismos existen barreras morfológicas, metabólicos secundarios y proteínas antimicrobianas.

2.2 Inmunidad innata en plantas

2.2.1 Barreras morfológicas de las plantas

Las plantas pueden poseer *mecanismos constitutivos* de defensa que proveen de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa *estructurales constitutivos*, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, desarrollo de espinas, espigas, pelos glandulares, entre otros; y mecanismos de defensa *químicos constitutivos*, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. Algunos ejemplos de este tipo son las plantas cianogénicas como el sorgo (*Sorghum* sp.) y la yuca (*Manihot sculenta*) que poseen cantidades considerables de compuestos relacionados con el ácido cianhídrico (HCN) (Osbourn 1996; Croteau *et al.*, 2000). A estos compuestos químicos se les denomina metabolitos secundarios. De esta forma, los mecanismos constitutivos

de resistencia en las plantas se basan en los rasgos distintivos de una especie o cultivar particular y generalmente no involucra una respuesta activa del hospedante ante la presencia del patógeno.

2.2.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica por que participan en la adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos (virus, bacterias y hongos), c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Wink, 1999).

2.2.2.1 Características generales de los metabolitos secundarios

En la actualidad, se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de metabolitos secundarios, que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contiene nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. La variabilidad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Wink, 1999).

Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shiquimato. Una síntesis constitutiva y específica de metabolitos secundarios puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular. Existen también

metabolitos secundarios que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de las plantas, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, a través de su redistribución por el xilema y/o el floema, o por el espacio apoplástico (Edwards y Gatehouse, 1999). La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides sesquiterpenos y dolicoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tienen lugar en la mitocondria. Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas, tales como ductos de resina, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999).

2.2.3 Metabolitos secundarios con acción antimicrobiana aislados de plantas

Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios (Schultes, 1978). Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos. La razón de ser de estos compuestos se desconoce por el momento. Existen distintas teorías: podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano, o realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin.

Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados. Los principales grupos de compuesto generados por plantas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas

Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (tomillo)	General
	Acido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	<i>S. aureus</i>
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i>	VIH
Tanino		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	virus
		<i>Melissa officinalis</i> (melisa)	
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
Flavonas	Catequina	<i>Camelia sinensis</i>	Bacterias
	Isoflavona	<i>Millettia thonningii</i>	Bacterias
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Bacterias
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	general

Domingo y López-Brea, 2008

2.2.3.1 Fenoles y heterósidos fenólicos (Compuestos fenólicos simples)

Son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido, Algunos ejemplo los constituyen el catecol, el pirogalol y los ácidos cinámico y cafeico. Los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo es posible que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos. El mecanismo parece estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas. Dentro de este grupo cabe destacar también los aceites esenciales, compuestos causantes del agradable olor de determinadas plantas y algunos con poder antimicrobiano, como el mentol y la capsaicina (Cichewicz y Thorpe, 1996)

2.2.3.2 Quinonas

Las quinonas son anillos aromáticos con dos grupos funcionales ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando

son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio. Un ejemplo es la hipericina, una antraquinona aislada de la planta de San Juan (*Hypericum perforatum*) (Miskowki, 2002).

2.2.3.3 Taninos

El término tanino se empleó para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados, en función de que puedan o no ser hidrolizados. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias. Un ejemplo es el tanino presente en el eucalipto (Cruz *et al.*, 2002).

2.2.3.4 Cumarinas

Son compuestos derivados de la benzo- α -pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras. El mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el DNA eucariota, lo que explica también su actividad antiviral.

2.2.3.5 Flavonas y compuestos relacionados

Las flavonas son estructuras fenólicas que contiene un grupo carbonilo. Constituye la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas. Un ejemplo son las catequinas, presentes en el té verde, las cuales ejercen actividad frente a diversos microorganismos (Yildirim *et al.*, 2000). Otros flavonoides tienen en general actividad antiviral, como la glicirricina, sintetizada por el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) (Fukai *et al.*, 2002).

2.2.3.6 Alcaloides

Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. Un ejemplo son los derivados de la corteza de la *Cinchona officinalis* (quinina y quinidina), utilizados en el tratamiento de la malaria. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Warhurst, 1981).

2.2.4 Péptidos antimicrobianos (PAM)

Uno de los elementos de la inmunidad innata que tiene un papel crucial para combatir las infecciones son los péptidos antimicrobianos (PAM). Estas proteínas de bajo peso molecular aparecen en organismos primitivos y se han conservado hasta los mamíferos.

En términos generales los PAM son péptidos de bajo peso molecular (usualmente menores a 10 kDa), la mayoría de los péptidos antimicrobianos son catiónicos, lo que significa que tienen una carga positiva a un pH fisiológico, debido al gran contenido de arginina y lisina (residuos cargados positivamente) en relación con el de ácido aspártico y ácido glutámico (residuos cargados negativamente), generalmente, con una carga neta entre +2 y +9 y una proporción substancial ($\geq 30\%$) de residuos hidrofóbicos. Además, este carácter catiónico puede ser reforzado por una amidación en el extremo C terminal. Frecuentemente, los péptidos antimicrobianos adoptan estructuras anfipáticas con extremos hidrofóbicos que encaran otros hidrofílicos, lo que les confiere propiedades para interaccionar con las membranas (Hancock y Rosek, 2002). La gran diversidad de los péptidos antimicrobianos no sólo se debe a que se han encontrado en todos los animales, sino a su variada estructura química y composición. Evolutivamente, estos péptidos se han desarrollado por procesos de duplicación, divergencia y presión selectiva, dada la interacción de cada especie con su ambiente y patógenos específicos (Dassanayake *et al.*, 2007).

2.2.4.1 Clasificación

Hasta el 2010 se habían descrito cerca de 1528 PAMs provenientes de diversos organismos incluyendo humanos, plantas, invertebrados marinos, anfibios, peces y microorganismos. A pesar de la diversidad de organismos de donde provienen, los PAM conocidos hasta ahora se clasifican en cinco grupos de acuerdo a su composición de aminoácidos, carga y estructura (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los péptidos antimicrobianos basada en los aminoácidos que los componen, la carga neta y la estructura secundaria

Tipo de PAM	PAM representativos	Origen
Péptidos aniónicos	Dermacidina	Glándulas sudoríparas humanas
	Maximin	Anfibios
Péptidos catiónicos lineales de hélice α	Cecropinas A	Insectos
	Magainina 2	Anfibios
	Melitina	Veneno de abeja
Péptidos catiónicos enriquecidos para aminoácidos específicos	PR-39 (ricos en prolina y arginina).	Cerdo
	Abaecina (ricos en prolina)	Abeja
	Histatina-5 (ricos en histidina)	Saliva humana
Péptidos aniónicos y catiónicos que contienen cisteína y forman puentes disulfuro	Brevenina	Rana
	Protegrinas	cerdo
	Defensinas	Epitelio de mamíferos e insectos y plantas
Péptidos catiónicos o aniónicos que son fragmentos de proteínas mayores	Lactoferrina	Leche bovina
	Casodinicina I	Caseína humana

Epand y Vogel, 1999; Bradshaw, 2003; Brodgen, 2005; Téllez y Castaño, 2010

2.2.4.2 Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de los PAM son variados y están relacionados con complejas interacciones moleculares, debido a la diversidad de sus mecanismos de acción, su naturaleza anfifílica y su carga catiónica, en comparación con los antibióticos convencionales, como los beta-lactámicos, con un único mecanismo de acción. Esto hace a los péptidos antimicrobianos difíciles de estudiar, pero al mismo tiempo, más interesantes. Aunque por muchos años el dogma ha sido que los péptidos antimicrobianos interactúan con las membranas bacterianas aumentando la permeabilidad, actualmente se han descubierto blancos adicionales a estas (Figura 1).

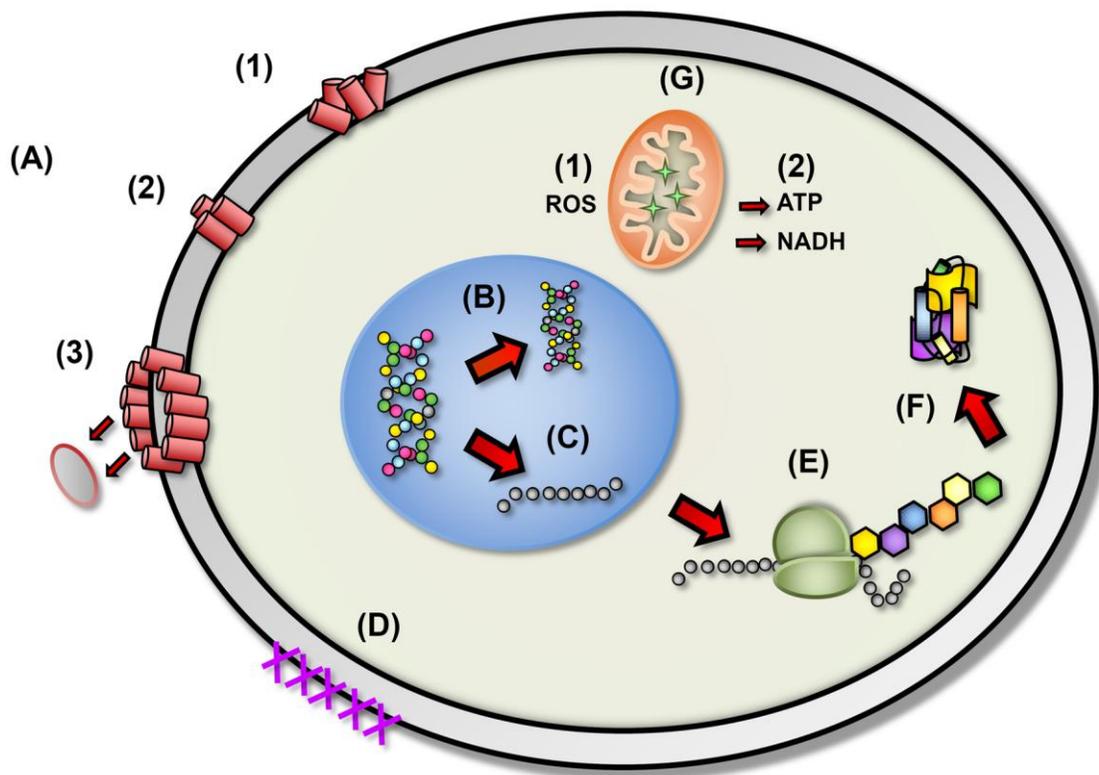


Figura 1. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos en células microbianas. (A) Alteración de la integridad de la membrana: (1) la inserción aleatoria en la membrana, (2) la alineación de secuencias hidrofóbicas, y (3) la eliminación de las secciones de la membrana y formación de poros. (B) Inhibición de la síntesis de ADN. (C) El bloqueo de la síntesis de ARN. (D) La inhibición de las enzimas necesarias para la unión de las proteínas estructurales de la pared celular. (E) La inhibición de la función del ribosoma y la síntesis de proteínas. (F) El bloqueo de las proteínas necesarias para el plegado de proteínas. (G) Focalización de las mitocondrias: (1) la inhibición de la respiración celular y la inducción de la formación de ROS y (2) alteración de la membrana celular mitocondrial, la integridad y la expulsión de ATP y NADH. Peter *et al.*, 2010.

La interacción inicial de los PAM con las bacterias, generalmente, es producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las Gram positivas o los lipopolisacáridos en las Gram negativas. Después de esta

interacción, los péptidos antimicrobianos generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, permitiendo la translocación de estos mismos a través de la bicapa externa; una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir daños en la membrana, el siguiente paso es la permeabilización de la membrana, este mecanismo se da por la formación de poros en la membrana debido a las interacciones con los PAM, como resultado se lleva a cabo la lisis celular por choque osmótico (A2,3) (Ogata *et al.*, 1992; Boman, 1995; Boman, 2003).

El mecanismo de acción de los PAM también puede variar dependiendo de la concentración del mismo, por ejemplo, a altas concentraciones los PAM pueden tapizar la membrana plasmática generando rápidamente micelas provocándole la lisis celular, mientras que a bajas concentraciones, los PAM pueden formar lentamente los poros en la membrana, también pueden insertar su región polar entre los fosfolípidos de la membrana atravesándola de lado a lado, provocando el adelgazamiento de la misma o pueden atravesar la membrana plasmática sin causarle daño y atacar o bloquear un blanco intracelular (Hancock y Rozek, 2002; Brogden, 2005).

2.2.4.3 Mecanismos intracelulares de los PAM

Hay evidencia creciente que indica que los péptidos antimicrobianos tienen blancos intracelulares, además de sus interacciones con las membranas plasmáticas, debido a que se han identificado blancos en el interior de células microbianas y el mecanismo por el cual los péptidos antimicrobianos pueden entrar en la célula microbiana sin afectar su estructura exterior mediante transporte pasivo (Nicolas, 2009).

Se han propuesto dos mecanismos generales para describir el proceso mediante el cual los PAM entran a las células microbianas; translocación asistida por lípidos de manera espontánea y translocación membranal asistida por un receptor estereoespecífico. Estos mecanismos de internalización varían dependiendo del tipo de PAM y de la célula sobre la cual actúa, además, la composición de aminoácidos de los PAM juegan un papel crucial en la internalización, ya que al

estar compuestos en su mayoría por aminoácidos básicos (arginina y lisina principalmente), los PAM pueden interaccionar de una mejor manera con los lípidos de la membrana permitiéndoles el paso al interior (Nicolas, 2009).

Una vez que los PAM acceden al interior de las células microbianas, estos interfieren en sus funciones metabólicas como; alterar el citoplasma, aglutinar los contenidos intracelulares, modificar las vías de señalización (apoptosis), regular la transcripción de ciertos genes, unirse a los ácidos nucleicos e inhibir el proceso de transcripción, inhibir la síntesis de la pared celular, la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas o la actividad enzimática (Brodgen, 2005).

2.2.5 Péptidos antimicrobianos de plantas

La mayoría de los PAM de plantas caracterizados tienen un peso molecular en el rango de los 2 y los 10 kDa, son básicos y contienen 4, 6, 8 ó 12 cisteínas que forman enlaces disulfuro que le confieren estabilidad estructural a las hojas- β y las hélices- α , además de estabilidad termodinámica (Segura *et al.*, 1998; García *et al.*, 2001; Lay y Anderson, 2005).

Los PAM de plantas pueden dividirse en cuatro clases principales (Tabla 3): las proteínas de transferencia de lípidos (LPT), las tioninas, las defensinas, las tipo heveínas y knottinas (péptidos de unión a quitina) (Broekaert *et al.*, 1997). Adicionalmente existen PAM descritos en plantas, que no entran en esta clasificación, considerando que no se encuentran en bases de datos. A partir de febrero de 2010, en base a la lista de base de datos de los PAM de plantas, existen más de 270 secuencias (Hammami *et al.*, 2009). Además de las familias de péptidos señalados arriba, se reconocen a los ciclótidos, snakinas y β -barrelinas como PAM de plantas (Mulvenna *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Tabla 3. Péptidos antimicrobianos de plantas

Clase de péptido	Número de aminoácidos	carga	Enlaces disulfuro
LPT	90-100	+8	4
Tioninas	45-47	+7 o +10	3 o 4
Defensinas	40-50	+6	4
Péptidos de unión a quitina			
Tipo heveina	~50	-1	4
Tipo Knottin	~30	+3	3
Ciclótidos	28-37	-2 a +3	3

2.2.5.1 Proteínas de transferencia de lípidos

El grupo de las proteínas antimicrobianas conocidas como proteínas de transferencia de lípidos (LTPs, por sus siglas en inglés), se encargan de transferir lípidos de una membrana donadora a otra que actúa como aceptora. Las membranas donadoras generalmente son liposomas naturales o artificiales, mientras las membranasceptoras son los organelos citoplásmicos tales como cloroplastos y mitocondrias. Las LTPs están divididas en dos subfamilias con masas moleculares relativas de de 9 kDa (LTPs 1) y 7 kDa (LTPs 2), ambas son capaces de transferir varios tipos de lípidos polares tales como la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y galactolípidos. Debido a su baja especificidad las LTPs también son conocidas como proteínas de transferencia de lípidos no específicas (García-Olmedo *et al.*, 1995; Sellitrenikoff *et al.*, 2001).

Las LTPs consisten principalmente de segmentos α -hélice (40% de la estructura secundaria total) conectadas por puentes disulfuro. Además poseen un surco o cavidad hidrofóbica donde se asocia la cadena alifática de los lípidos. Estudios de inmunocitlocalización han mostrado que las LTPs están presentes en las paredes

celulares de varias especies (Castro y Fontes., 2005; Sellitrenikoff *et al.*, 2001). La información acumulada acerca de las LTPs sugiere que este tipo de proteínas están involucradas en la defensa vegetal contra organismos patogénicos tales como *Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.* y *Pyricularia oryzae* (Kader *et al.*, 1996) dado que además de exhibir una importante actividad antimicrobiana, la expresión de sus genes incrementa rápidamente justo después de la infección (Kader *et al.*, 1996).

2.2.5.2 Tioninas

Las tioninas constituyen una familia de péptidos básicos ($pI > 8$) de bajo peso molecular (~5 kDa), ricos en aminoácidos básicos que contienen (Arg, Lys) y otros conteniendo grupos sulfhidrilo (Cys). Además de sus efectos tóxicos contra bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Erwinia sp.*, *Corynebacterium sp.* (Carmona *et al.*, 1993), y hongos fitopatógenos (Meyer *et al.*, 1996), este grupo de péptidos comparten cierta similitud estructural y de secuencia de aminoácidos. Se han aislado a partir del endospermo (Florack y Stiekema., 1994) y hojas (Bohlmann y Apel, 1991) de trigo, semillas de *Crambe abyssinica* (Colilla *et al.*, 1990) y *Pyricularia pubera* (Vernon *et al.*, 1985), así como de hojas de cebada (Meyer *et al.*, 1996). Adicionalmente se ha descrito que esta familia de péptidos tiene efectos citotóxicos sobre células tumorales cultivadas in vitro, tal es el caso de los fibroblastos de ratón L929, las células de hámster BHK-21, las células HeLa y las células de mono CV10.

2.2.5.3 Defensinas

Las defensinas inicialmente también conocidas como γ -tioninas) son un grupo especial de péptidos antimicrobianos que han sido aislados a partir de semillas de trigo, cebada, sorgo, rábano y otras especies de *Brassicaceae* (Terras *et al.*, 1993; Méndez *et al.*, 1990), por algunas de sus características (secuencia de aminoácidos y actividad antimicrobiana) inicialmente fueron agrupadas con el grupo de las α y las β tioninas (Terras *et al.*, 1992) Posteriormente se determinó que las γ -tioninas eran un grupo con poca o escasa relación con las α y β tioninas

por lo que se reclasificaron y renombraron como defensinas. Se han descrito representantes de esta clase de péptidos en vertebrados, invertebrados y plantas (Thomma *et al.*, 2002).

El mecanismo a través del cual las defensinas vegetales ejercen su efecto inhibitorio *in vivo* sobre los microorganismos patógenos aún no es del todo claro dado que algunos de los integrantes de esta familia se ha visto que *in vitro* inhiben la síntesis de proteínas (Clastle *et al.*, 1999). Estudios alternos han sugerido que las defensinas vegetales parecen unirse específicamente a los canales de potasio (Spelbriak *et al.*, 2004) o de sodio (Thevissen *et al.*, 1997) inhibiendo su acción. Esta propiedad es relevante dado que solo ha sido descrita para dos compuestos de naturaleza proteica, las defensinas vegetales (Broekaert *et al.*, 1995) y las μ -conotoxinas (Broekaert *et al.*, 1995), neurotoxinas, aisladas del veneno de *Conus*, un molusco con amplia distribución en el Océano Pacífico.

2.2.5.4 Péptidos de unión a quitina

La heveína es una proteína rica en glicina y prolina, que tiene la capacidad de unirse a quitina y oligómeros de N-acetilglucanos. Presenta un tamaño reducido de 43 aminoácidos y posee 8 cisteínas que forman los 4 puentes disulfuro responsable de la su estabilidad estructural. Debido a su capacidad de unirse a carbohidratos, la heveína también se considera una lectina. Así las proteínas que presentan uno o más dominio de tipo heveína se clasifican dentro de la superfamilia de las lectinas. Se propuso que la actividad antifúngica de estas proteínas se basa en su capacidad de unirse a quitina. Sin embargo Os *et al.* (2003) demostraron que dos proteínas de tipo heveína de *Pharbitis nil* presentan actividad antifúngica *in vitro*, contra hongos que tiene o no-quitina en su pared celular.

Las proteínas tipo Knottin comprenden una familia de proteínas pequeñas (25 a 35 aminoácidos) cuya estructura tridimensional se caracteriza por una peculiar disposición de 3 puentes disulfuro, donde uno de ellos atraviesa el círculo formado por los otros 2 (Tam *et al.*, 1999). Esta es la característica estructural que agrupa a todas las proteínas tipo knot, ya que no presentan homología a nivel de secuencia.

Las proteínas tipo knottin tienen varias funciones biológicas, y aun que todavía no se ha demostrado, parece ser que ejercen su acción por la interacción con receptores, ya sean de proteínas, azúcares o lípidos (Gelly *et al.*, 2004; Shao *et al.* 1999). Este es el caso de la proteína Pa-AFP aisladas de plantas de *Phytolacca americana* (Shao *et al.*, 1999).

2.2.5.5 Ciclotidos

Los ciclotidos son péptidos cíclicos de origen vegetal contienen de 28 a 37 residuos de aminoácidos, tienen diversas actividades biológicas, incluyendo anti-VIH, antimicrobiana e insecticida. Los ciclotidos han sido aislados principalmente de tres familias de plantas, *Violaceae*, *Rubiaceae* y *Cucurbitaceae* (Craik *et al.*, 1999) Los ciclotidos están conformados por un esqueleto cíclico, formado por una periodicidad continua de uniones peptídicas, contienen 6 residuos de cisteína, que forman 3 puentes disulfuro que estabilizan la molécula, confiriéndole propiedades físicas, que incluyen la resistencia a la degradación térmica y enzimática (Colgrave y Craik, 2004). Esta estabilidad pueden atribuirse a su esqueleto cíclico y a los puentes disulfuro que, al formar el arreglo estructural nudo de cistina cíclico, otorgan gran estabilidad a la molécula (Craik *et al.*, 2006). La función natural de los ciclotidos en las plantas, teniendo en cuenta su actividad insecticida, es como moléculas de defensa, mientras que sus otras actividades biológicas (que incluyen las actividades uterotónica, anti-VIH, antitumoral y antimicrobiana) les otorga un gran potencial como moléculas líderes para el desarrollo de nuevas drogas en las industrias farmacéutica y agroquímica.

2.3 Inmunidad inducida en las plantas

2.3.1 Proteínas PR (Pathogenesis Related Proteins)

La otra estrategia que las plantas utilizan para defenderse es el mecanismo denominado resistencia inducida, está dado por sistemas inducibles que sólo se activa cuando la planta se ve desafiada por una infección o daño. Una vez que el contacto ha sido establecido, el patógeno libera e induce la defensa por parte de la planta reforzando las paredes celulares, produciendo fitoalexinas y sintetizando proteínas relacionadas con la defensa, también llamadas “*pathogenesis-related*”

(PR). Se complementan las barreras estructurales de la planta ante una infección microbiana, un ataque de insectos y ante los desafíos medioambientales. Las proteínas PR constitutiva contribuyen a la resistencia basal de plantas sanas contra los patógenos, y se producen en concentraciones elevadas a la infección o la exposición al estrés. Un gran número de proteínas PR son inducibles, en las hojas están presentes constitutivamente así como en tejidos de almacenamiento, tales como semillas y frutos (van Loon *et al.*, 2006).

La familia de proteínas PR incluye a proteínas con características y actividades diversas y cuya acción final es la inhibición del patógeno. Las proteínas con actividades enzimáticas como son las glucanasas, quitinasas, ribonucleasas y peroxidasas ejercen su efecto sobre el patógeno a través de su acción sobre las estructuras celulares, como sucede en las paredes celulares, ácidos ribonucleicos, o el balance redox en el cual el patógeno sobrevive. Estas proteínas tienen además pesos moleculares intermedios (entre 20 y 40 kDa). Adicionalmente, en las proteínas PR también se incluye al grupo de familias que comprenden a proteínas y péptidos de bajo peso molecular (PAMs) las cuales han sido descritas anteriormente.

2.3.1.1 Descubrimiento y definición

Las proteínas PR fueron descubiertos en los años 70 por dos grupos independientes (Gianinazii *et al.*, 1970; Van Loon y Kammen, 1970). Fueron detectados en las hojas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco. Las proteínas PR se definen como proteínas vegetales inducidas en situaciones patológicas o relacionadas, como la infección por oomicetos, hongos, bacterias, virus o ataque de insectos, así como por otro tipo de estrés como pueden ser herida, frío, exposición a productos químicos o metales pesados (Van Loon y Strien, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Más tarde, se encontró la expresión de las PR en plantas sanas, y se ha encontrado que participan en el desarrollo controlado de órganos y tejidos específicos. Desde que fueron descubiertas, se han aislado y caracterizado a partir de una amplia gama de especies de plantas

(Chandrashekar y Satyanarayana, 2006; Muthukrishnan *et al.*, 2001).

2.3.1.2 Distribución y localización

Las proteínas PR están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se han identificado en numerosos géneros de plantas tanto mono y dicotiledóneas y también se encuentran en todos los órganos. Estas proteínas inducibles, provocada por el medio ambiente y los estímulos de desarrollo, están presentes también constitutivamente en los diferentes órganos de las plantas. Las PR se acumulan localmente en el sitio de la infección, y de manera sistemática en toda la planta como parte de la resistencia sistémica adquirida contra más infecciones (Van Loon *et al.*, 2006). Una característica general de las PR es la presencia de isoformas localizadas en diferentes compartimentos de las células. Las PRs se localizan típicamente en los espacios extracelular, intercelular, en el apoplasto, o en la vacuola. El apoplasto es el sitio principal de la acumulación de PR. Las PR son generalmente sintetizadas con la secuencia N-terminal, con la determinación en el retículo endoplásmico seguida por la secreción en el apoplasto. A veces también se depositan en el espacios vacuolar (Van Loon *et al.*, 2006). Las PR extracelulares son las proteínas que tienen contacto con agentes patógenos antes de que causen daño a los tejidos, mientras que las PR ubicadas en vacuolas actúan como una segunda línea de defensa. La potencia antimicrobiana de las diferentes PR depende de las concentraciones y combinaciones (Anad *et al.*, 1994).

2.3.1.3 Clasificación

La clasificación de las proteínas PR, se basa en grupos de familias que comparten secuencias de aminoácidos, relaciones serológicas y la actividad enzimática o biológicas. La clasificación inicial propuesta que incluía cinco familias de PR se amplió para dar cabida a otras familias (Van Loon y Strien , 1999; Van Loon *et al.*, 1994). Actualmente, las PR se clasifican en 17 grupos, numeradas en el orden en que fueron descubiertas (Van Loon *et al.*, 2006). (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de las familias de proteínas PR

Familia	Miembro tipo	Propiedad
PR-1	PR-1a de tabaco	Antifúngica
PR-2	PR-2 de tabaco	β -1,3-glucanasa
PR-3	P,Q de tabaco	Quitinasa de tipo I,II,IV,V,VI,VII.
PR-4	R de tabaco	Quitinasa de tipo I, II.
PR-5	Tabaco S	Tipo taumatina
PR-6	Inhibido I de tomate	Inhibidor de proteasa
PR-7	P ₆₉ de tomate	Endoproteinasa
PR-8	Quitinasa de pepino	Quitinasa de tipo III
PR-9	Peroxidasa productora de lignina de tabaco	Peroxidasa
PR-10	PR-1 de perejil	Tipo ribonucleasa
PR-11	Quitinasa de clase V de tabaco	Quitinasa de tipo I
PR-12	Rs-AFP3 de rábano	Defensina
PR-13	THI2.1 de Arabipodsis	Tionina
PR-14	LTP4 de cebada	Proteína transferidora de lípidos
PR-15	OxOa (germin) de cebada	Oxalato oxidasa
PR-16	OxO LP de cebada	Tipo oxalato oxidasa
PR-17	PRp27 de tabaco	Desconocida

Van Loon, 2006

2.4 Bromeliaceae

Las Bromelias son miembros de una familia grande de plantas denominadas Bromeliaceae, la bromelia mejor conocida es la piña. La familia Bromeliaceae es exclusiva de América, donde se encuentran casi 2500 especies. La única excepción es *Pitcairnia feliciana* de África. Las Bromelias se encuentran de Virginia en los Estados Unidos hasta el sur de Argentina. Hay ciertas regiones del mundo con una gran variedad de especies tales como México, las Antillas, Costa Rica, en el este y el sur de Brasil, los Andes de Colombia, Perú y Chile (Córdoba *et al.*, 2000).

2.4.1 Clasificación

Bromeliaceae es una familia del orden de las Bromelias (Angiospermas, Monocotiledonae). Basados en sus hábitos de crecimiento y otras características, las bromeliaceas se dividen en las subfamilias Pitcairnioideae, Tillandsioideae y Bromelioideae (Black y Dehgan, 1993).

Con respecto a la subfamilia Pitcairnioideae, casi todas son terrestres. En algunos géneros las flores tienen ovario súpero; en otros es ínfero. El fruto habitualmente es una cápsula que encierra varias semillas desnudas o dotadas de apéndices. El margen foliar con frecuencia es espinoso; dentro de ella encontramos los géneros: *Abromeitiella*, *Ayensua*, *Brocchinia*, *Connelia*, *Cottendorfia*, *Deuterocohnia*, *Dickia*, *Enchollirium*, *Fosterella*, *Hochtia*, *Navia*, *Pitcarnia*, *Puya* (Plantencyclo.com, 2004). La subfamilia Pitcairnioideae incluye en total 16 géneros.

En cuanto a la subfamilia Tillandsioideae, la mayoría de las especies de éste grupo son epífitas. Casi todas ellas tienen flores de ovario súpero. El fruto es una cápsula que contiene varias semillas plumosas. Algunos géneros son: *Catopsis*, *Glomeropitcairnia*, *Guzmania*, *Mezobromelia*, *Tillandsia*, *Vriesea* (Plantencyclo.com, 2004). La subfamilia Tillandsioideae incluye en total nueve géneros.

Por último la Subfamilia Bromelioideae, recibe éste nombre en honor al botánico sueco Olef Bromel. Las flores tienen ovario ínfero; el fruto es una baya. El margen foliar con frecuencia es espinoso. En ella encontramos los géneros:

Acanthostachys, *Aechmea*, *Ananas*, *Andreana*, *Androlepis*, *Araeococcus*, *Billbergia*, ***Bromelia***, *Canistrum*, *Cryptanthus*, *Fascicularia*, *Fernsua*, *Gravisia*, *Greigia*, *Hohenbergia*, *Hohenbergiopsis*, *Neoglaziovia*, *Neoregelia*, *Nidularium*, *Ochagavia*, *Orthophytum*, *Porlea*, *Pseudoananas*, *Quesnelia*, *Ronnbergia*, *Streptocalyx*, *Wittrockia* (Plantencyclo.com, 2004). La subfamilia Bromelioideae incluye en total 31 géneros, una de las especies es la *Bromelia pinguin*.

2.5 *Bromelia pinguin*

Es una especie de planta perteneciente a la familia de las Bromeliáceas y subfamilia Bromelioideae. Es originaria de México extendiéndose por toda la América tropical.

Sinonimia popular

Piñuelilla. Yucatán: *ch'am*, *ch' amch o*, *ch'om*, *jman*, *tslbay*, *ts'alvay*.

Sinonimia botánica

Ananas pinguin Trev.; *Karatas pinguin* Miller; *Bromelia pinguin* L.; *Bromelia fastuosa* Lindl.

2.5.1 Descripción

Bromelia pinguin es una planta herbácea con hojas en forma de rosetas, erguidas, de 1 a 2 m de largo y de 2 a 4 cm de ancho, el borde con espinas curvas de 5 a 10 mm. Antes de la floración las hojas cambian de color verde brillante a rojizas en la base. Su inflorescencia es un racimo compuesto con el tallo de color blanco. Las flores crecen en grupos en un eje corto, son blancas o rosáceas cuyos pétalos miden alrededor de 3 cm, se producen en un panículo denso que se encuentra en el corazón de la planta. El vástago de la flor tiene hasta 100 flores rojas rosáceas. El rosetón principal muere después de florecer. Su fruto consiste en una baya de forma ovoide amarilla-verdosa terminada en un pico. El fruto es carnoso con semillas pardas rojizas, subglobosas, algo aplanadas, de 4 a 5 mm de diámetro.

2.5.2 Reproducción

La reproducción de *Bromelia pinguin* puede ser sexual y también vegetativa. En la reproducción sexual, las semillas que se encuentran en el fruto y en el cogollo, son emitidas por la planta después de realizarse el corte del fruto. El polen también es transportado por medio del viento y los insectos dando lugar a la fecundación.

La reproducción en forma vegetativa es cuando el brote lateral da lugar a un hijuelo o brote lateral. La mejor forma de reproducir las plantas de *B. pinguin* es en forma vegetativa a través de la separación de plantas o hijuelos que crecen por encima del suelo. Las semillas germinan fácilmente si son sembradas cuando están maduras en macetas con sustrato arenoso (Botany.com, 2004; Faucon, 1998).

2.5.3 Hábitat

Bromelia pinguin habita en clima cálido al nivel del mar hasta los 200 m, está asociada a dunas costeras y bosque tropical caducifolio. Nativa en la Península de Yucatán, la piñuela tiene su hábitat en un clima cálido, con precipitaciones pluviales superiores a los 1200 mm anuales, y soportando largos períodos de sequía. La calidad de la pulpa depende de la cantidad de lluvia que reciba en el verano. La piñuela crece en suelos pedregosos entre 50 a 1500 m sobre el nivel del mar, pobres en materia orgánica (Novelo, 1994).

2.5.4 Usos de *B. pinguin*

En relación a los usos de la planta de *B. pinguin*, data desde tiempos ancestrales descritos en la literatura en donde los aztecas las utilizaban para curar ampollas en la boca producidas por fuegos, así como para evitar el edema o hidropesía (Ortiz de Montellano, 1974). Adicionalmente desde tiempos prehispánicos se utilizó la cocción de hojas contra picaduras de insectos, serpientes y escorpiones ya sea vía oral o tópica (Coe y Anderson, 1996) A finales del siglo XVIII Vicente Cervantes señala: "cuando sus frutos están sazonados, se extrae la parte carnosa, de la que se saca el zumo, con el cual se hace un jarabe y se usa diluido en agua común como antiescorbútico, habiéndose aplicado con favorables efectos a los diabéticos, se asegura igualmente que quita la embriaguez" (Cervantes, 1889). La

inflorescencia joven es comestible y tiene rico sabor. El fruto de la planta es también comestible, pero en forma asada o sancochada, también se pueden hacer bebidas frías alcohólicas y vinagre. Se usa mucho contra parásitos intestinales y como diurético y antirreumático. Los frutos se pelan y se trituran, los frutos maduros y cocidos tienen un sabor parecido a la piña y son vermicidas. Cuando las espigas están tiernas, están formadas por capas de hojas blancas y pulposas que se comen cocidas como verduras al igual que los frutos. Otro uso de la piñuela es como planta ornamental y se utiliza, por sus hojas espinosas como cerco en terrenos grandes o alrededor de viviendas, ya que cuando es cultivada forma anchos y densos matorrales difíciles de penetrar. Las fibras de las hojas son largas, relativamente bastante fuertes, y se usan para hacer tejidos, cordeles de pescar y mallas (FAO, 1993).

3. ANTECEDENTES

3.1 Estudios realizados en *B. pinguin*

Un estudio farmacognóstico de *B. pinguin* mostró que el tamizaje fitoquímico realizado a diferentes partes de la planta (hojas, tallos y frutos), se detectaron de forma general, la posible presencia de los siguientes metabolitos secundarios: aceites secantes, carotenos, hidrocarburos, azúcares reductores, triterpenos-esteroles, saponinas, taninos, aminoácidos y flavonoides. Estos resultados coinciden con lo informado por la literatura para otras partes de la planta (tallo basal y raíces). La composición cualitativa de las diferentes partes de la planta es similar, pero se observan algunas diferencias en los distintos estados vegetativos y como resultado del secado (Abreu-Payrol y Miranda, 2000).

Estudios farmacológicos preliminares de un extracto hidroalcohólico concentrado de los frutos mediante bioensayos sencillos y confiables; determinaron que la toxicidad frente a *Artemia salina* Leach, resultó muy baja. Se probó la actividad antihelmíntica contra *Lombricus terrestris*, con resultados relevantes. El extracto no mostró actividad contra diversas cepas de hongos y bacterias (Abreu-Payrol *et al.*, 2001a).

El estudio del extracto etéreo de frutos de *B. pinguin* mediante el sistema acoplado CG-EM, detectó la presencia de los ácidos 2-pentenodioico, octanodioico, ftálico, cítrico, nonanodioico, 12-metiltetradecanoico, palmítico, oleico, linolénico, esteárico, 11,14,17-eicosatrienoico y 11,14-eicosadienoico. La identificación fue realizada sobre la base de los tiempos de retención y fue confirmada por comparación de los espectros de masas con los de patrones. Por primera vez es informada la presencia de estos compuestos en los frutos de *B. pinguin* L. (Abreu-Payrol *et al.*, 2001b).

El cromatograma gaseoso de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentó aproximadamente 35 picos cromatográficos, de ellos 2 mayoritarios, detectados por ampliación de las zonas cromatográficas. El análisis de los espectros de

masas permitió confirmar la identificación de 12 componentes. El componente mayoritario fue el ácido linolénico, seguido por el ácido esteárico y luego por el ácido palmítico. Se observa la presencia de ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos, así como de ácidos aromáticos. Siendo el primer reporte de la composición de ácidos grasos de este fruto (Abreu *et al.*, 2001b).

Otro estudio encaminado a elucidar la actividad antimicrobiana, fue realizado con extractos de metanol de la pulpa del fruto de *B. pinguin*, en donde se evaluó la actividad antifúngica. El extracto mostró una actividad significativa contra algunas cepas de *Trichophyton*, *Paecilomyces ariotii* ATCC 22319 aunque las cepas de *Candida* fueron en general poco sensibles (Camacho-Hernández *et al.*, 2002).

El estudio de algunos de los parámetros bromatológicos del fruto de *B. pinguin* arrojaron resultados interesantes, ya que revelaron valores de elementos nutricionales como son: proteínas (13.87%), carbohidratos (5.31%), sustancias minerales (2.16-0.32%) y fibra dietética (3.35%), factor que constituye otra fuente de utilidad para este fruto. Se confirmó que los frutos de esta especie contienen principios activos con actividad antihelmíntica, que con mucha probabilidad son endopeptidasas cisteínicas, reconocidas por poseer esta actividad. El jugo de la pulpa del fruto también mostró cierta actividad antitrichomoniasis, este resultado preliminar parece interesante, aunque necesita estudiarse con mayor detalle, ya que no hay reportes en la literatura del empleo de esta especie, o de las proteasas cisteínicas, como antiprotozoario (Abreu-Payrol *et al.*, 2005).

Pinguinaína es el nombre dado a una preparación de enzimas proteolíticas obtenidas de frutos de *B. pinguin* que ha sido poco estudiado. El estudio sobre un nuevo examen de las proteasas presentes en frutos de *B. pinguin* crecida en Cienfuegos, Cuba. Mostró que la preparación (parcialmente purificada de pinguinaína, PPP) presentó las principales características de las proteasas de cisteína, el pH, se encontró dentro del rango óptimo de las proteasas alcalinas (pH 7.2-8.8), la inhibición de la actividad proteolítica por el efecto de agentes reductores, que suele ser revertido por la adición de cisteína, una notable estabilidad térmica y una notable estabilidad a elevados valores de fuerza iónica. El isoelectroenfoque y el zimograma del extracto PPP revelaron la presencia de

varios componentes proteolíticos con pl de 4.6 a 8.1. La purificación preliminar de las peptidasas mediante cromatografía de intercambio catiónico mostró la presencia de dos fracciones principales que presentan actividad proteolítica con masas moleculares de aproximadamente 20 kDa, de acuerdo al SDS-PAGE (Abreu-Payrol *et al.*, 2005).

Los frutos se han utilizado en la medicina tradicional como antihelmíntico, probablemente debido a la presencia de una mezcla de endopeptidasas de cisteína, inicialmente se denominó pinguinaína. Con el propósito de conocer los componentes presentes en esta preparación se realizó una purificación y caracterización de los cuatro componentes principales de esa mezcla, dos de ellos con pl ácido y los otros dos con pl alcalino. Las masas moleculares (SDS-PAGE y MALDI-TOF), N-terminal de la secuencia y la reactividad y parámetros cinéticos en comparación con sustratos sintéticos (ésteres del ácido p-nitrofenil-N-alfa-amino-CBZ, PFLNA, Z-Arg-Arg-p-NA, y Z-Phe-Arg-p-NA) de las peptidasas estudiadas se determinó mediante la comparación de las secuencias N-terminal de las enzimas y el grado de homología con endopeptidasas de otras *Bromeliaceae*. Los resultados muestran que no es una sola enzima y que estas no son idénticas a la bromelina encontradas en otras frutas (Abreu-Payrol *et al.*, 2008).

Recientemente se realizó un estudio en Sinaloa, México, el cual incluyó la caracterización fisicoquímica, nutricional y antibacteriana de los frutos de *B. pinguin* L. La caracterización fisicoquímica y nutricional del fruto mostró que podría ser considerado como un alimento funcional. La parte comestible se caracteriza por un alto contenido de vitamina C (126 mg/100 g), cenizas (10.6 g/100 g ps), fibra cruda (3.4 g/100 g p.s.) calcio (1290 mg/100 g ps), magnesio (500 mg/100 g ps), manganeso (2.95 mg/100 g ps) y es una buena fuente de zinc (2.8 mg/100 g p.s.) en la fracción polar. Adicionalmente encontraron que en la fracción metanólica tiene componentes con actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas humanas, esta actividad podría estar asociada a compuestos fenólicos presentes en el fruto, la fracción con mayor actividad antimicrobiana fue rica en taninos y flavonoides específicamente. Por lo tanto, el consumo de la piñuela debería ser beneficioso para la salud humana y se deberían realizar esfuerzos para elaborar y

aplicar estrategias para el desarrollo sostenible del uso de este recurso (Pío-León *et al.*, 2009).

En resumen todos estos estudios se han realizado en extractos etéreos obtenidos a partir de disolventes orgánicos. Los primero encaminados a estudiar compuestos del metabolismo secundario tales como terpenos y flavonoides. Otros básicamente dirigidos exclusivamente a la caracterización de la pinguinaína, la enzima más abundante en los frutos de *B. pinguin*, Los más recientes dirigidos para estudiar los componentes fitoquímicos, bromatológicos y nutrimentales presentes en esta planta.

Con base en lo anterior en este trabajo se propuso la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana de extractos proteicos obtenidos con amortiguadores acuosos de frutos y semillas de *B. pinguin* contra bacterias patógenas.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Extraer y caracterizar la actividad antimicrobiana de extractos proteicos de fruto y semillas de *Bromelia pinguin*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el amortiguador adecuado para la extracción de las proteínas totales contenidas en frutos y semillas de *B. pinguin*.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos sobre bacterias patógenas.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra bacterias patógenas.
4. Purificar y concentrar a la(s) proteínas con posible actividad antimicrobiana, mediante columnas de filtración en gel y membranas con diferente tamaño de corte (3 y 30 KDa).
5. Determinar el tamaño molecular de las proteínas con posible actividad antimicrobiana, mediante ensayos de autobiografía en geles de poliacrilamida.
6. Evaluar la toxicidad de los extractos, mediante ensayos de actividad hemolítica sobre glóbulos rojos humanos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Los frutos de piñuela fueron colectados en el municipio de Tizimín, Yucatán, recién cosechados se limpiaron, eliminando la pelusa de la cáscara, y se almacenaron a 4 °C.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

5.2 Extracción de proteína

Los frutos congelados a -20 °C fueron separados de la cáscara y las semillas. La pulpa y las semillas fueron maceradas en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El macerado se homogenizó en presencia de los diferentes amortiguadores de extracción: 100 mM Tris-HCl pH 7.5 adicionado con 10 mM NaCl, 10 mM de cisteína y 1.5 µg/ml de leupeptina; 100 mM Na₃PO₄ pH 6.0 adicionado con 10 mM NaCl, 10 mM de cisteína y 1.5 µg/ml de leupeptina; 100 mM CH₃COONa pH 5.0 adicionado con 10 mM NaCl, 10 mM de cisteína y 1.5 µg/ml de leupeptina. La relación de amortiguador de extracción fue de 1 mL/g de tejido. La homogenización se realizó a 4 °C, los homogenados fueron centrifugados a 16,000 g durante 30 minutos, se recuperó el sobrenadante (extracto crudo) y se re-centrifugó a 100, 000 g durante 45 minutos para separar la fracción soluble de la membranal; se recuperó el sobrenadante (extracto soluble) y la pastilla se re suspendió en 500 µl del amortiguador de extracción correspondiente.

5.3 Determinación de concentración de proteína

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el procedimiento descrito por Bradford (1976); empleando una curva estándar con la proteína albúmina sérica bovina.

5.4 Métodos electroforéticos

La preparación del gel se realizó siguiendo el método de Laemmli (1970). Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15%. Los extractos fueron preparados con amortiguador de Laemmli 1X y desnaturalizados a 95 °C durante 5 minutos, cantidades equivalentes de proteína total, soluble y membranal (50 µg) fueron aplicados en cada carril. Como referencia se adicionó un carril en el cual se aplicó una mezcla de proteínas denominada marcadores de peso molecular. La electroforesis se llevó cabo a 100 V durante 2 h.

Transcurrido el tiempo de corrida, el gel se tiñó con nitrato de plata o con azul de Coomassie. Para la tinción con nitrato de plata el gel fue incubado en una solución de fijación (etanol al 25%, ácido acético 10%, formaldehído) durante toda la noche en agitación constante. Para la tinción con azul de Coomassie el gel se incubó durante una 1 hora en la solución (0.025% de Coomassie R-250, 10% de ácido acético, 40% metanol). Posteriormente el gel se incubó en una solución de etanol al 25%, ácido acético 10%, para eliminar el exceso del azul de Coomassie. Finalmente el gel fue secado entre dos hojas de papel celofán a temperatura ambiente.

5.5 Ensayo de autobiografía en gel

Terminada la electroforesis, el gel se incubó en 50 ml de una solución de tritón X-100 al 1% en agua, durante 20 minutos en agitación constante y a temperatura ambiente, posteriormente se lavó brevemente en agua y se adicionó 50 ml de medio LB estéril, se dejó en agitación 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el medio LB y se colocó en una caja Petri estéril para realizar el vaciado con la bacteria (el inóculo inicial fué de 0.5 en la escala McFarland), se dejó solidificar y se incubó toda la noche a 37 °C.

La posición de la actividad sobre el gel fue detectado como una banda clara por que no hay crecimiento bacteriano. Se corre un gel en paralelo para comparar el Rf (Vigers *et al.*, 1991).

5.6 Determinación de actividad proteolítica sobre gel

La evaluación de la actividad proteolítica se realizó en geles de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE), copolimerizados con 0.05% de gelatina. Los geles fueron cargados con 20 μg de proteína y sometidos a electroforesis en las condiciones ya descritas. Al concluir la electroforesis, los geles fueron incubados en una solución de 2.5% de Tritón X-100 adicionado con 1 mM de β -mercaptoetanol a 37 °C durante 1 hora. Para renaturalizar a las proteínas, los geles se transfirieron a un amortiguador compuesto de Tris-HCl 200 mM, pH 7.0 adicionado con 1 mM de β -mercaptoetanol e incubados a 37 °C, toda la noche. Se decantó la solución de incubación y la actividad de proteasa se reveló a través de la tinción con azul de Coomassie de la gelatina no digerida. La presencia de áreas o bandas negativas (sin tinción) indicó la presencia de actividad de proteasa (Michaud, 1998).

5.7 Actividad antimicrobiana

Se realizó mediante la prueba de difusión en agar, con el uso de discos de papel. Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido, y posteriormente se evidencia por la formación de halos claros.

Las cepas ATCC (American Type culture collection) de *Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* 27853, fueron cultivadas en medio LB-Agar a 37° C durante 12 horas. El inóculo inicial fue de 0.5 en la escala McFarland, esto equivale a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). La bacteria fue homogenizada con medio LB-agar previamente esterilizado, y fue vertido en una caja Petri, una vez que el medio quedó sólido se colocaron discos de papel filtro, sobre el cual se adicionó concentraciones crecientes de proteína de los diferentes extractos proteicos. Como control positivo se utilizó ampicilina en una concentración de 100 μg . El control negativo consistió en adicionar 50 μl del amortiguador en el cual fue obtenido el extracto proteico. Las cajas Petri fueron incubadas a 37° C durante 12 horas y los resultados fueron observados después de 12 y 24 h de incubación. La formación de halos

transparentes alrededor de los discos indicó la inhibición del crecimiento microbiano (Schwalbe, 2007).

5.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para evaluar la concentración mínima inhibitoria, se empleó el método de diluciones seriadas en medio LB. Los tubos con las diluciones de los extractos fueron inoculados con los microorganismos e incubados a 37 °C. Se utilizó una concentración de bacterias con 0.5 en la escala McFarland. Transcurridas las 24 horas las muestras fueron cuantificadas a 600 nm en un espectrofotómetro. La CMI se consideró como la concentración más baja del antimicrobiano que inhibía el crecimiento del microorganismo a 37 °C durante 24 horas. Se utilizó dos blancos, un tubo sin inóculo y otro conteniendo amortiguador de extracción solamente.

5.9 Purificación por cromatografía de filtración en gel

Se utilizó resina Sephadex G-25, se hidrató con amortiguador de 100 mM Tris-HCl, pH 7.5. Se utilizó una columna de 25 cm de largo X 1.5 cm de diámetro. El volumen de extracto fue de 1 ml y se colectaron fracciones de 800 µl, a cada fracción se le midió la absorbancia a 280 nm para medir la cantidad de proteína, adicionalmente se prepararon geles de poliacrilamida al 15% para observar el perfil proteico de las fracciones con lecturas significativas a 280 nm.

5.10 Concentración en unidades de filtración por tamaño de corte

Se utilizaron unidades de filtración de la marca Millipore (Amicon®) (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland), para concentrar y purificar a las proteínas contenidas en los diferentes extractos, estos Amicon vienen provistas de membranas con tamaño de corte para proteínas mayores a 30 y 3 kDa respectivamente y se siguió las instrucciones del fabricante (Millipore, # de catálogo UFC500308).

5.11 Determinación de actividad hemolítica

Se ensayó sobre glóbulos rojos humanos siguiendo el protocolo de Park *et al.* (2007), con algunas modificaciones. Nueve mililitros de sangre se mezclaron con 1

ml de citrato de sodio al 3.8 %, se homogenizó suavemente durante 5 minutos y se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el paquete de glóbulos rojos se lavó 3 veces con amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.4, adicionado con cloruro de sodio al 0.9%. Finalmente se realizó una suspensión al 0.5%, se tomó 0.9 ml y se incubó con 0.1 ml del extracto a evaluar durante 1 hora a 37 °C, posteriormente se centrifugó a 800 g durante 10 minutos. Se evaluó la hemólisis producida en el sobrenadante y fue cuantificado en un espectrofotómetro a 414 nm. Como control positivo se utilizó una solución de tritón X-100 al 0.1% y como control negativo se utilizó glóbulos rojos humanos en amortiguador de fosfatos (blanco). El porcentaje de hemólisis fue calculado siguiendo la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Hemólisis} = [(A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}) / (A_{\text{tritón}} - A_{\text{blanco}})] \times 100$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación del amortiguador adecuado para la extracción de las proteínas totales contenidas en frutos y semillas de *B. pinguin*.

Para determinar el amortiguador adecuado, se realizaron ensayos con tres amortiguadores para la extracción de la proteína total contenida en fruto ó semillas de *B. pinguin*.

En la Figura 2 se muestra el perfil proteico obtenido del fruto al ensayar tres amortiguadores de extracción con diferente pH (5.0, 6.0 y 7.5). Lo que se observó es un perfil de polipéptidos con amplio rango de peso molecular, que va desde 4 KDa hasta 209 kDa, siendo abundantes en el rango que va de 4-20 kDa y de 49-209 kDa para todas las condiciones ensayadas.

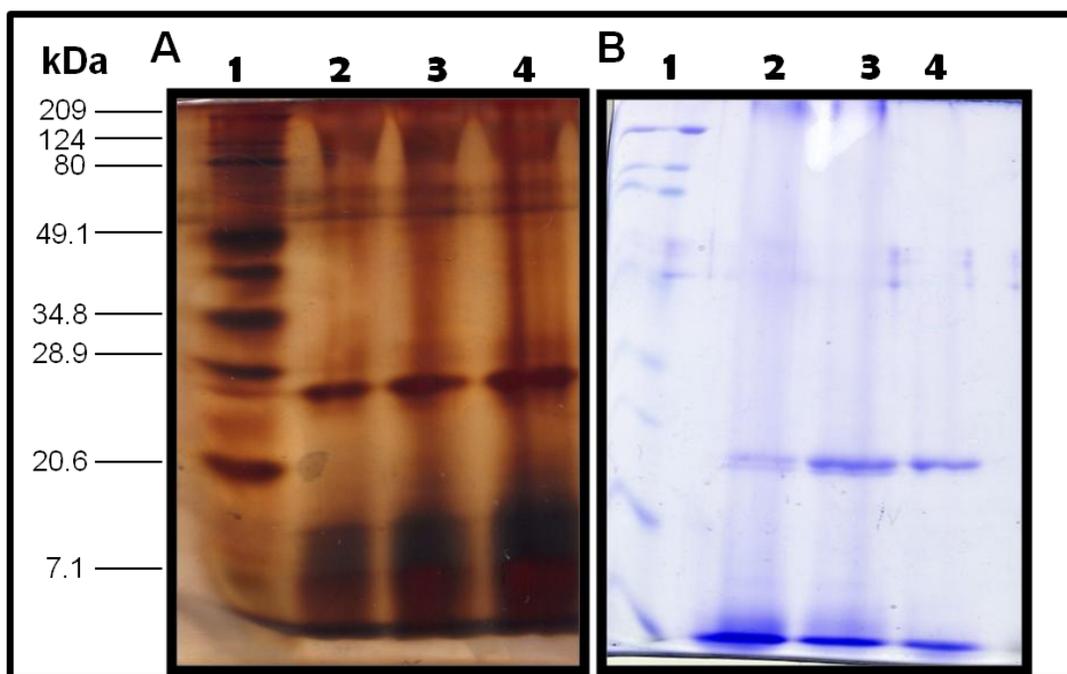


Figura 1. Perfil proteico de extractos de frutos de *B. pinguin*. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata (A) y teñido con azul de Coomassie (B),. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 amortiguador de acetato pH 5.0, carril 3 amortiguador de fosfatos pH 6.0 y carril 4 amortiguador Tris-HCl pH 7.5.

Se determinó que los amortiguadores de extracción tenía que estar adicionado con leupeptina y cisteína a concentraciones de 1.5 µg/ml y 10 mM respectivamente. La leupeptina es un inhibidor específico para proteasas de serina y cisteína y la cisteína se le adicionó como agente reductor para proteger a las proteínas.

También se determinó que el fraccionamiento de las muestras en los geles desnaturalizantes, requiere de condiciones controladas como la temperatura, ya que si las muestras contenidas en el amortiguador Laemmli se sometían a temperaturas mayores a 70 °C el perfil proteico se observaba como un barrido a lo largo del gel y ésto sugería fuertemente que las proteínas se degradan bajo estas condiciones.

Una razón por la cual se observó un perfil escaso de polipéptidos, puede deberse a la presencia de proteasas presentes en los extractos y que estén degradando al resto de las proteínas, si bien los amortiguadores de extracción contienen leupeptina, este inhibidor solo inhibe un grupo de proteasas, por lo que otras diferentes de serina y cisteína podrían estar presentes.

Los resultados muestran que al utilizar un amortiguador de acetatos pH 5, un amortiguador de fosfatos pH 6 y un amortiguador de Tris-HCl pH 7.5 no se observan diferencias significativas de los polipéptidos obtenidos (Figura 2, carril 2,3 y 4), al parecer el pH no afecta los perfiles de migración de las proteínas extraídas para los frutos de *B. pinguin*. Por consiguiente se determinó continuar trabajando con el extracto obtenido con el amortiguador Tris-HCl pH 7.5 para los siguientes experimentos.

Los resultados también que estos extractos presentan una acidez elevada (pH ~3-4), estas preparaciones se tornan amarillas en presencia de azul de bromofenol sin importar el amortiguador utilizado para su extracción.

En relación a los extractos obtenidos a partir de semilla, en la Figura 3 se muestran los resultados al ensayar los diferentes amortiguadores para la extracción de las proteínas contenidas en semillas de *B. pinguin*.

Se observa un perfil proteico similar al del fruto, un perfil de polipéptidos con amplio rango de peso molecular, que va de 4 kDa hasta 209 kDa, siendo abundantes en el rango que va de 10-28 kDa y 49-209 kDa para todas las condiciones ensayadas.

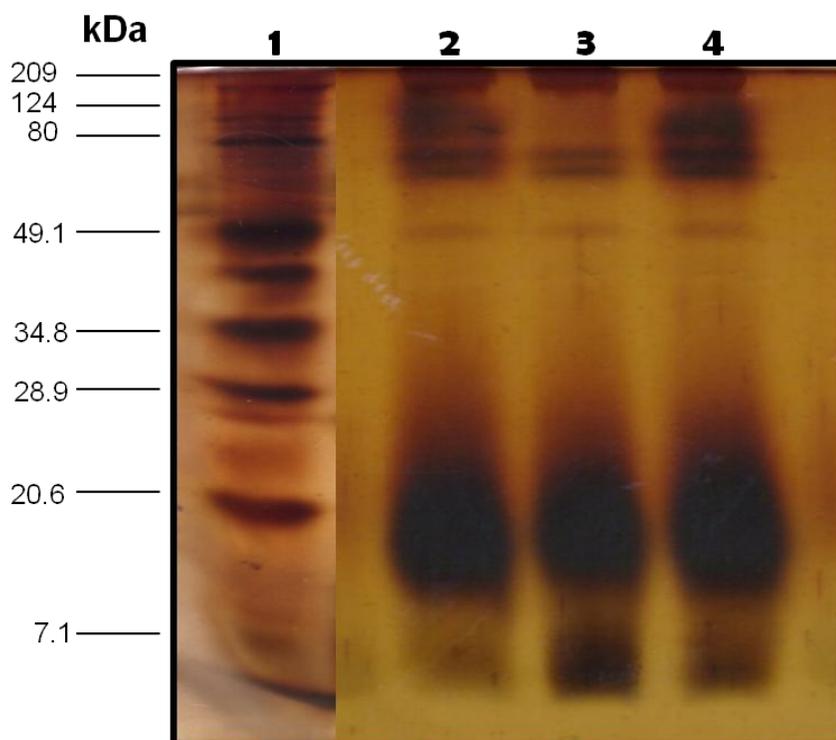


Figura 2. Perfil proteico de extractos de semillas de *B. pinguin*. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida teñido con nitrato de plata. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 amortiguador de acetato pH 5.0, carril 3 amortiguador de fosfatos pH 6.0 y carril 4 amortiguador Tris-HCl pH 7.5.

Al igual que para el caso del fruto los resultados muestran que al utilizar un amortiguador de acetatos pH 5, un amortiguador de fosfatos pH 6 y un amortiguador de Tris-HCl pH 7.5 no se observan diferencias significativas de los polipéptidos obtenidos, al parece el pH no afecta los perfiles proteicos extraídos para las semillas de *B. pinguin*. Por consiguiente se determinó continuar

trabajando con el extracto obtenido con el amortiguador Tris-HCl pH 7.5 para los siguientes experimentos.

A diferencia del fruto, la extracción de las proteínas de semilla no requirió condiciones controladas de temperatura para su análisis en geles desnaturalizantes, así como el uso de inhibidores de proteasas específicos.

Otra diferencia fue que estos extractos no presentaban acidez elevada a diferencia de los extractos obtenidos del fruto.

6.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos sobre bacterias patógenas

Se evaluó si los extractos presentaban actividad antimicrobiana sobre bacterias patógenas. En la Figura 4 se muestran los resultados al ensayar el extracto proteico total de fruto y semillas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A); contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (B) y contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C).

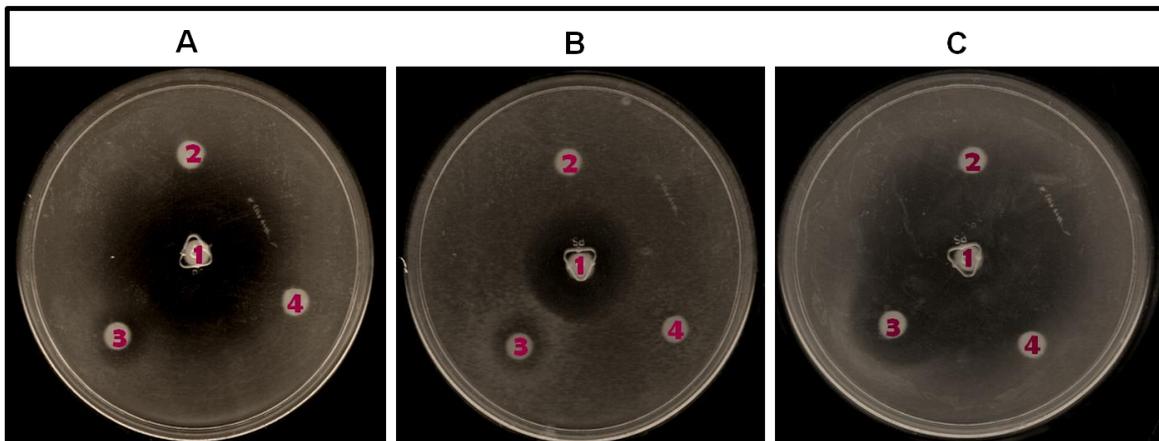


Figura 3. Ensayo de la actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A), *Escherichia coli* ATCC 35922 (B), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C) del extracto proteico total del fruto y semilla de *B. pinguin*. Ampicilina, 100 μg (1), amortiguador pH 7.5, 50 μl (2), extracto crudo del fruto, 120 μg de proteína total (3), extracto crudo de semilla, 120 μg de proteína total(4).

Los resultados muestran que el extracto total de fruto de *B. pinguin* presenta una fuerte inhibición del crecimiento bacteriano respecto al antibiótico para las tres bacterias control ensayadas. En contraste no se detectó actividad antibacteriana cuando se usó el extracto obtenido de las semillas, adicionando la misma cantidad de proteína en los dos casos (120 µg de proteína).

Adicionalmente se observó que la bacteria más sensible fue *Pseudomonas aeruginosa*, donde se tiene una mayor área de inhibición del crecimiento de la bacteria utilizando 120 µg de proteína total (Figura 4, panel C, disco 3).

El extracto total del fruto fue sometido a centrifugación a 100,000 g, resultando una separación de las proteínas: en el sobrenadante se mantuvieron las proteínas solubles (extracto soluble) y en la pastilla se mantuvieron las proteínas asociadas a membrana (fracción membranal).

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la separación anterior y los resultados se muestran, en la Figura 5 los ensayos corresponden al extracto total, extracto soluble, extracto membranal y extracto calentado a 100 °C sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A), *Escherichia coli* ATCC 25922 (B) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C).

En este experimento se confirmó que el extracto total presenta una fuerte inhibición del crecimiento de las bacterias evaluadas (Figura 5, Panel A, B, C, disco 3). Cuando se ensayó el extracto soluble se observó un resultado similar encontrando que este extracto presenta una fuerte inhibición del crecimiento de las bacterias evaluadas (Figura 5, Panel A, B, C, disco 4), en contraste cuando se probó el extracto membranal no presentó halo de inhibición para las bacterias evaluadas, indicando que no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de estas cepas (Figura 5, Panel A, B, C, disco 5).

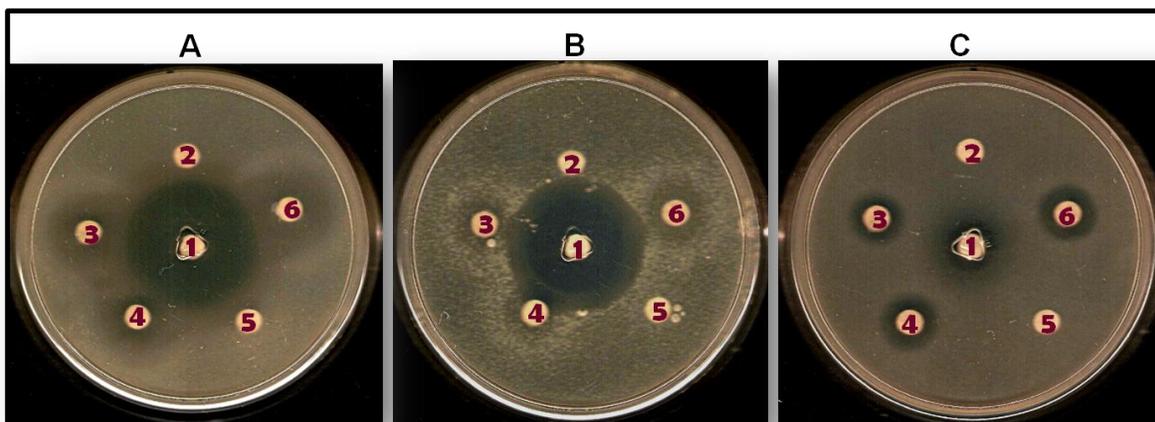


Figura 4. Ensayo de la actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A), *Escherichia coli* ATCC 35922 (B), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (C) del extracto proteico del fruto de *B. pinguin*. Ampicilina, 100 μg (1), amortiguador pH 7.5, 50 μl (2), extracto crudo, 120 μg de proteína (3), extracto soluble, 120 μg de proteína (4), extracto membranal, 120 μg de proteína (5), extracto total calentado a 100 $^{\circ}\text{C}$, 50 μl (6).

Adicionalmente, se encontró que al calentar a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos el extracto total, esta preparación conservó la propiedad de inhibir el crecimiento de las bacterias evaluadas, indicando que los compuestos responsables de la actividad parecen ser termoestables (Figura 5, panel A, B, C, disco 6).

Posteriormente los extractos fueron analizados en un SDS-PAGE de poliacrilamida al 15% (Figura 6) y se encontró que tanto el extracto total como el extracto soluble tienen un perfil similar de polipéptidos, mientras que en la fracción membranal se observan un perfil diferente.

La muestra que fue sometida a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos conserva un perfil proteico escaso, sin embargo se mantiene las proteínas que van del rango de peso molecular entre 5-20 kDa y entre 80-209 kDa.

Estos resultados sugieren que la mayor cantidad de proteínas contenidas en el extracto total del fruto parecen ser proteínas solubles.

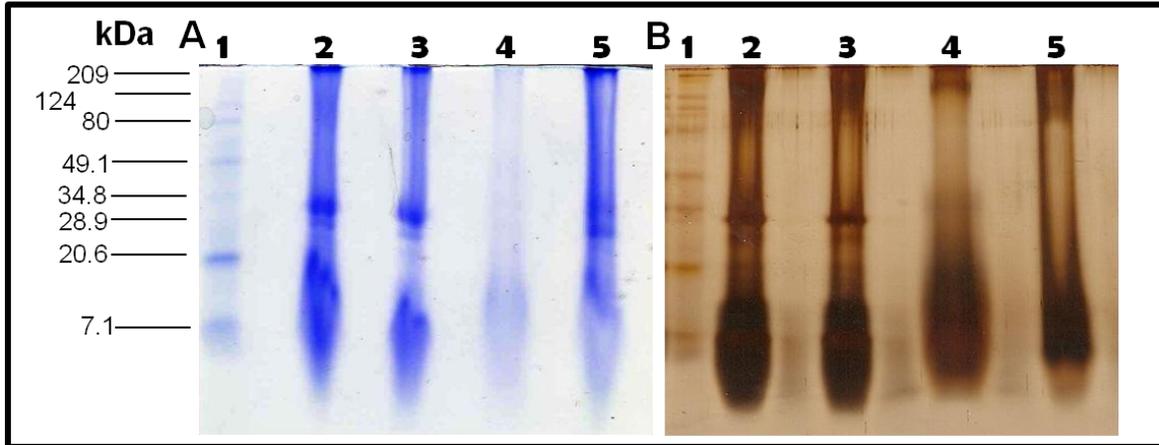


Figura 5. Perfil proteico de los extractos total, soluble y membranal del fruto de *B. pinguin*. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (A) y nitrato de plata (B). Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 extracto total, carril 3 extracto soluble, carril 4 extracto membranal y carril 5 extracto total calentado a 100^o C durante 30 minutos.

Debido a la resistencia que han adquirido los microorganismos patógenos por el uso indiscriminado de los fármacos convencionales, se han buscado alternativas para su control. En este sentido, las proteínas con actividad antimicrobiana (PAM), así como los compuestos del metabolismo secundario de las plantas, pueden ser una alternativa viable, ya que han demostrado tener efectos antibacterianos y antifúngicos, pueden inactivar virus, e incluso ser citotóxico en contra de células tumorales (Hancock y Scot, 2000; Risso, 2000; Loeza-Angeles., 2008) incluso algunos de estas proteínas ya están siendo utilizados de manera terapéutica, clínica y comercial (Papo y Shai, 2005).

Dado que el presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar la capacidad antibacteriana de extractos acuosos del fruto y las semillas de *B. pinguin* sobre bacterias patógenas, de manera particular sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Lo anterior se realizó con base en que se ha demostrado que la fracción proteica obtenida del jugo del fruto muestra actividad contra *Lumbricus terrestris* y *Trichomonas vaginalis* (Abreu-Payrol et al., 2005). Adicionalmente, extractos metanólicos de la pulpa del fruto tiene actividad

contra *Candida albicans* (Camacho-Hernández *et al.*, 2002) y extractos de las fracciones polares de la pulpa tiene actividad contra bacterias de los géneros: *Staphylococci*, *Streptococci*, *Enterococci*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* y *Pseudomonas*.

6.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto soluble sobre bacterias patógenas.

Se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto soluble respecto a la concentración de proteína sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 7), *Escherichia coli* ATCC 35922 (Figura 8) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 9).

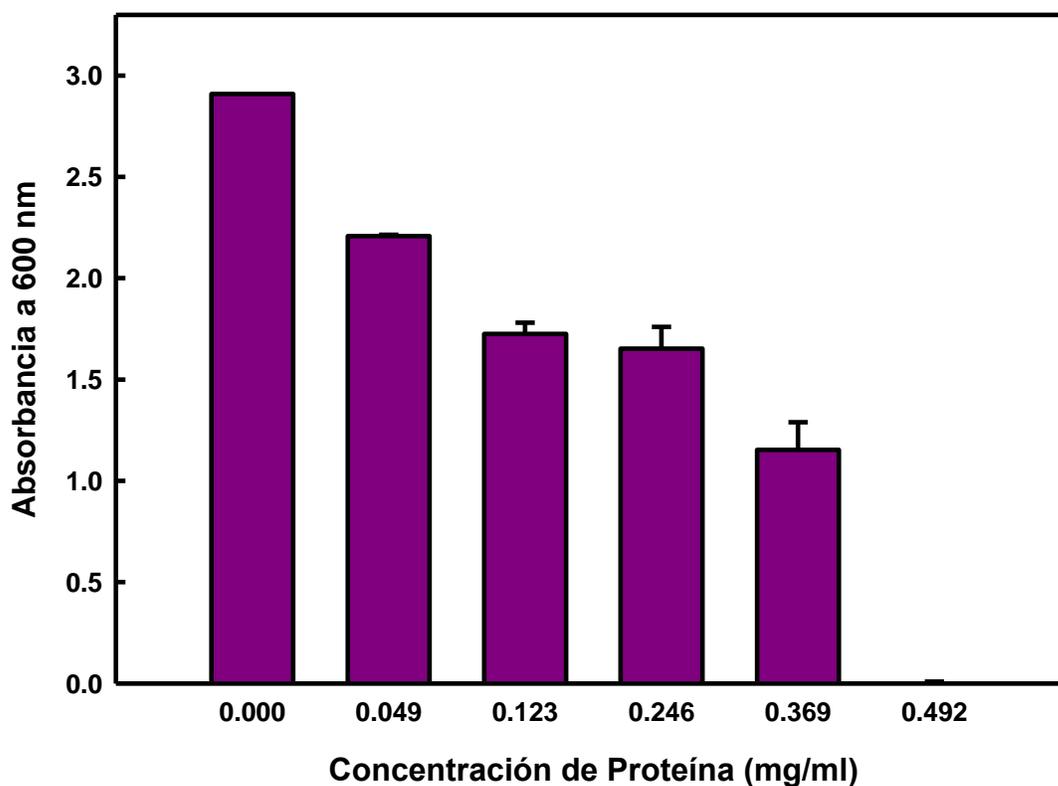


Figura 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto soluble de fruto de *B. pinguin* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 35922.

Encontrando para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 un valor de 0.492 mg/ ml, para *Escherichia coli* ATCC 25922 un valor de 0.984 mg/ml y para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 un valor de 0.492 mg/ml respectivamente. Estos resultados sugieren que estos extractos tienen compuestos activos con mucho potencial para ser utilizados en el tratamiento de infecciones ocasionadas por estas tres bacterias patógenas, ya que los valores obtenidos para inhibir el crecimiento de dichas bacterias son inferiores a los reportados en la literatura para esta planta.

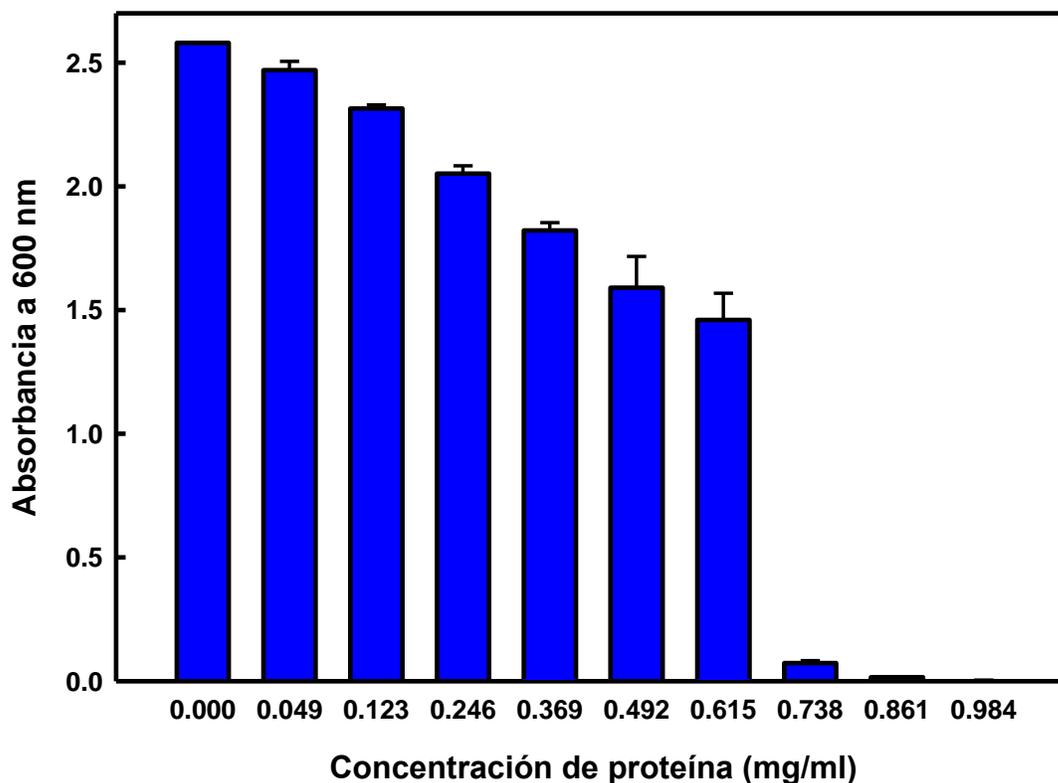


Figura 7. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto soluble de fruto de *B. pinguin* sobre *Escherichia coli* ATCC 25923.

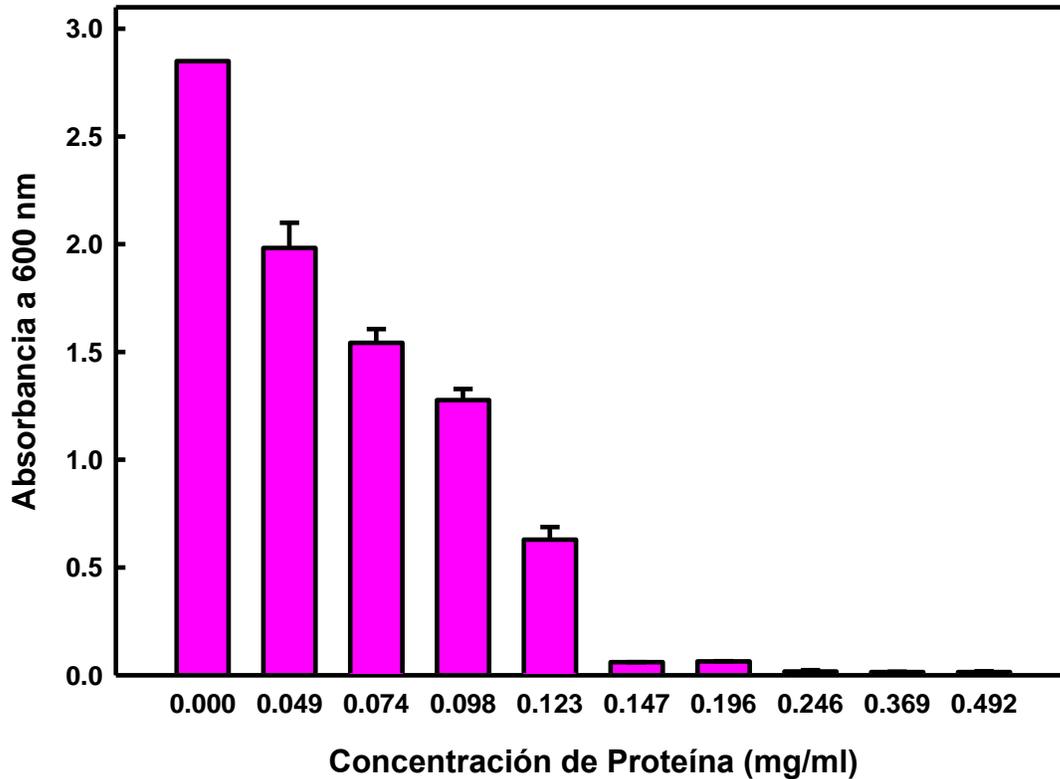


Figura 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto soluble de fruto de *B. pinguin* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Pío-León *et al.*, (2009) reportaron un rango de (CMI = 8-16 mg/ml) de extractos etéreos obtenidos del fruto de la planta de *B. pinguin* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus faecalis* ATCC 9212, *Streptococcus* grupo A-4, *Salmonella* grupo D, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Para las diferentes fracciones evaluadas encuentran que la fracción más activa fue rica en compuestos fenólicos, específicamente taninos y flavonoides.

En este trabajo se evaluaron los extractos solubles crudos en donde se encuentran tanto la fracción proteica como la fracción que corresponde a los

metabolitos secundarios, encontrando que ambos contribuyen a la propiedad de inhibir el crecimiento de las bacterias ensayadas.

6.4 Purificación parcial y concentración de la(s) proteínas con posible actividad antimicrobiana, mediante columnas de filtración en gel y unidades de centrifugación con membranas de tamaño de corte de 3 KDa.

Para caracterizar los compuestos responsables que contribuyen a la propiedad antimicrobiana del extracto soluble de *B. pinguin*, se utilizaron dos estrategias para separar a los compuestos por su tamaño molecular: cromatografía de filtración en gel y unidades de filtración (Amicon) con membranas de corte de 3 kDa y 30 kDa. Cuando el extracto soluble fue sometido a separación en una columna de filtración en gel conteniendo resina Sephadex G-25 se obtuvieron dos picos mayoritarios, indicando un grupo de compuestos que no interacciona con la resina, la cual se denominó P1 y otro grupo que se retarda y que interacciona con la resina, la cual se denominó P2 (Figura 10).

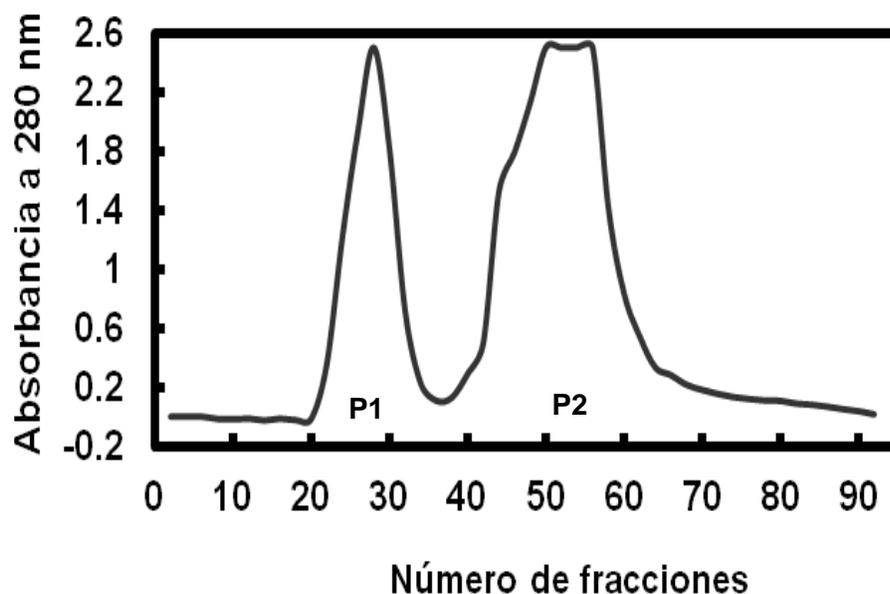


Figura 9. Cromatograma del extracto soluble en una columna conteniendo resina Sephadex G-25.

Estas dos fracciones fueron reunidas de la siguiente manera: para el P1 se tomaron las fracciones de la 16 a la 28 y para el P2 las fracciones de la 30 a la 62 de acuerdo a las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro a 280 nm.

Las fracciones fueron liofilizadas y luego resuspendidas en 300 μ l de amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 adicionado con leupetina 1.5 μ g/ml. Al cuantificar la cantidad de proteínas de las dos fracciones se obtuvo una concentración elevada de proteína para la fracción P1 (3.20 mg/ml) y una concentración baja para la fracción P2 (0.22 mg/ml).

Al analizar estas dos fracciones en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% (Figura 11) se observó para la fracción P1, dos zonas correspondientes a proteínas con elevado peso molecular que van en un rango de aproximadamente entre 90 y 209 kDa y otra zona con un peso aproximado entre 5 y 20 kDa. En contraste para la fracción P2 no se observó ninguna banda.

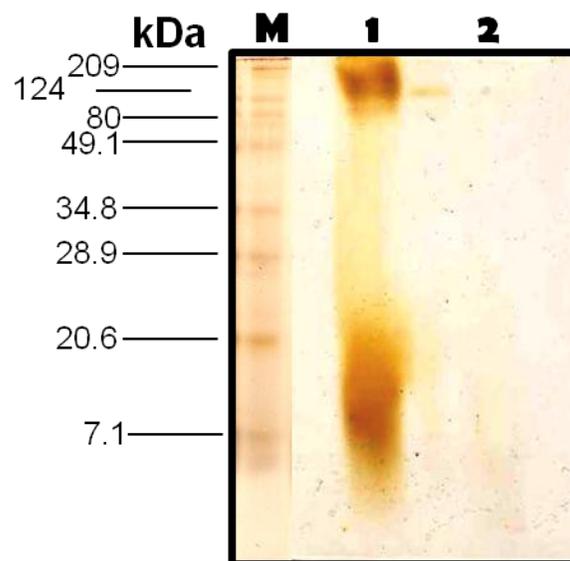


Figura 10. Perfil proteico del extracto soluble después de ser fraccionado en una columna conteniendo resina Sephadex G-25. Gel de poliacrilamida al 15%, teñido con nitrato de plata. Marcador de peso molecular, 3 μ l (M), pico 1, 10 μ g de proteína (1), pico 2, 20 μ l (2).

Las fracciones denominadas P1 y P2 fueron evaluadas para determinar si presentaban actividad antimicrobiana utilizando a la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25923. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana del extracto soluble después de ser fraccionada en una columna conteniendo Sephadex G-25 sobre *Escherichia coli* ATCC 25923

Muestras evaluadas	Área de inhibición (mm)
Ampicilina (100 µg)	3 ± 0
Amortiguador (50 µl)	0
P1 (107 µg)	1.03 ± 0.047
P2 (6.5 µg)	1.18 ± 0.045

Se encontró que tanto el P1 como el P2 fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*. Estos resultados sugieren que las dos fracciones contienen compuestos activos que inhiben fuertemente el crecimiento de *E. coli*.

La otra estrategia utilizada para caracterizar a los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, fue utilizar unidades de filtración (Amicon) conteniendo membranas con tamaños de corte de 3 kDa y 30 kDa. Estos dispositivos permiten separar moléculas por su tamaño molecular, la diferencia entre la cromatografía en gel reside en que es mucho más fácil y rápido. El principio se basa en centrifugar la muestra por tiempos cortos teniendo una membrana que solamente permite el paso a ciertas moléculas dependiendo del tamaño de corte de la membrana. Utilizando el Amicon de 3 kDa, se retienen moléculas mayores o iguales a 3 kDa y en el filtrado resultante se concentran las moléculas menores a 3 kDa. En la Figura 12 se muestran los resultados al someter el extracto soluble en un Amicon con una membrana de 3kDa, en el panel A se evaluó la actividad

antimicrobiana de los extractos obtenidos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 3592.

Se determinó que la actividad antimicrobiana está dada tanto por compuestos de peso molecular mayores o iguales a 3 kDa, así como por compuestos menores a 3 kDa,

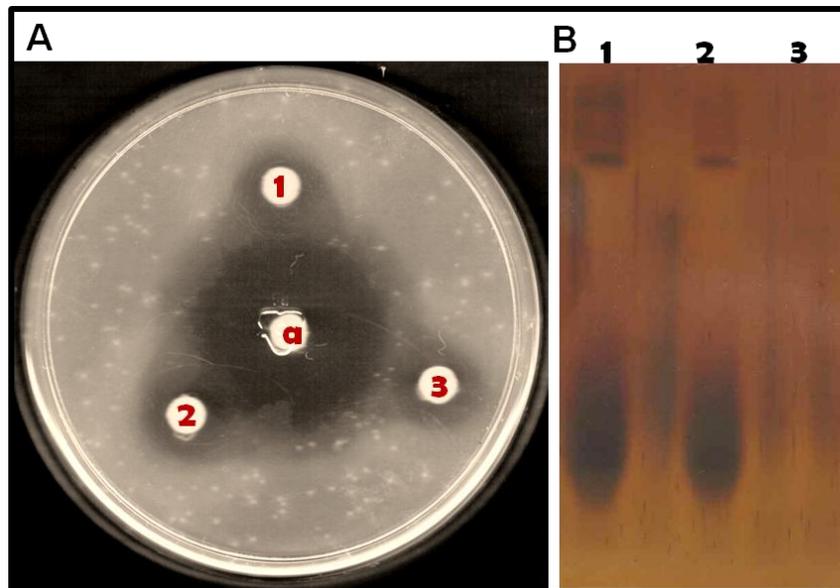


Figura 11. Ensayo de la actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A) y perfil proteico (B) del extracto soluble posterior a la aplicación en un Amicon de tamaño de corte de 3 kDa. Panel A: Ampicilina, 100 µg (a), extracto soluble total, 120 µg (1), extracto \geq 3 kDa, 120 µg (2), extracto $<$ 3 kDa, 50 µl (3). Panel B, gel de poliacrilamida al 15% teñido con nitrato de plata: extracto soluble total, 10 µg (1), extracto \geq 3 kDa, 10 µg (2), extracto $<$ 3 kDa, 20 µl (3).

Al cuantificar la cantidad de proteína contenida en los extractos, se encontró que en la fracción mayor o igual a 3 kDa se concentró 4 veces la cantidad de proteína en referencia a la muestra original y que en el filtrado no fue posible detectar proteína. Este dato se corrobora en el panel B, donde se muestran los perfiles proteicos de los extractos, encontrando que en el carril 3 que corresponde al filtrado no se tiñó ningún polipéptido, indicando ausencia de proteínas.

Estos datos sugieren fuertemente que el extracto soluble de *B. pinguin* contiene proteínas y compuestos pequeños no proteicos que contribuyen fuertemente a la propiedad de inhibir el crecimiento bacteriano.

En este trabajo se demostró que los extractos proteicos de *B. pinguin* contienen compuestos de bajo peso molecular además de los de naturaleza proteica, se sugiere que los compuestos de bajo peso molecular podrían tratarse de metabolitos secundarios que contribuyen a la actividad antimicrobiana contra dos importantes patógenos humanos como lo son: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, estos microorganismos están reportados como resistentes a diferentes antibióticos en México (Benavides-Plascencia *et al.*, 2005, Velázquez-Meza, 2005).

6.5 Determinación del tamaño molecular de la(s) proteínas con posible actividad antimicrobiana, mediante ensayos de autobiografía en geles de poliacrilamida

Para conocer a las proteínas responsables de la actividad antimicrobiana, se realizó un experimento donde el microorganismo fue directamente colocado sobre un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. En la Figura 13 se muestran los resultados del perfil proteico (panel A), de la actividad antimicrobiana (panel B) y de la actividad de proteasa (panel B) del extracto soluble después de ser concentrado en un Amicon con tamaño de corte de 3 kDa y otra de 30 kDa.

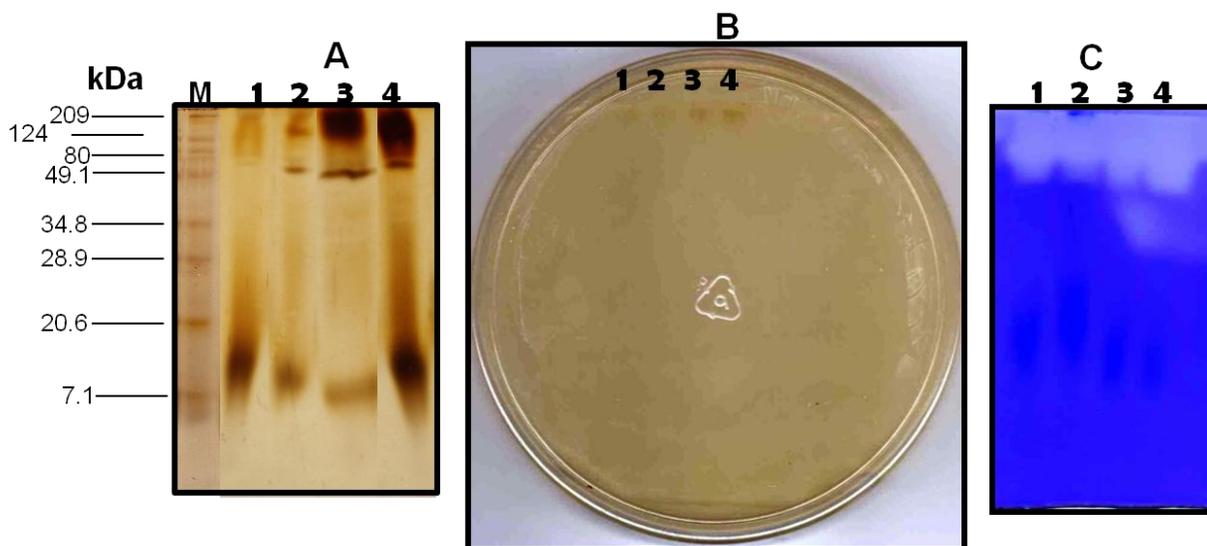


Figura 12. Perfil proteico (A), ensayo de autobiografía sobre gel de la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (B) y actividad proteolítica (C) de extractos de *B. pinguin* posterior a la aplicación en un Amicon con tamaño de corte de 3kDa y 30 kDa. Panel A: marcador de peso molecular (M), extracto crudo, 10 μ g (1), extracto soluble, 10 μ g (2) extracto \geq 3 kDa, 10 μ g (3), extracto \geq 30 kDa, 10 μ g (4). Panel B y C: extracto crudo, 40 μ g (1), extracto soluble, 40 μ g (2) extracto \geq 3 kDa, 40 μ g (3), extracto \geq 30 kDa, 40 μ g (4).

En el panel A, se observa un perfil proteico similar para todas las muestras ensayadas, con un enriquecimiento de las proteínas de alto peso molecular entre el rango de 50 a 200 kDa para las fracciones concentradas en el Amicon, así mismo se observa un comportamiento semejante para los polipéptidos pequeños principalmente cuando se utiliza el Amicon conteniendo el tamaño de corte de 30 kDa.

El ensayo de autobiografía en gel (panel B), revela un área de inhibición correspondiente a proteínas mayores o cercanos a 200 kDa, en referencia al gel teñido con nitrato de plata corrido bajo las mismas condiciones. Esto sugiere que la o las proteínas responsables de la inhibición de la bacteria son proteínas cuyo peso molecular se encuentra en un rango de 200-209 kDa.

Con el objetivo de continuar caracterizando a las proteínas responsables de la actividad antimicrobiana y con los antecedentes de que los frutos de *B. pinguin* contienen cantidades elevadas de proteasas, se realizó un ensayo de la actividad de proteasa de los mismos extractos anteriormente descritos (panel C). Encontrando que para todos los extractos evaluados se detectó una fuerte degradación de la gelatina copolimerizada dentro del gel, estos resultados muestran que esta actividad está dada por el grupo de proteínas de peso molecular alto en un rango que abarca desde 49 hasta 209 kDa.

La caracterización parcial de estas proteínas sugiere fuertemente que se trata de proteínas solubles, de peso molecular grande y que los resultados de la actividad de proteasa también sugiere que se trata del grupo de proteínas descritas como peptidasas, las cuales son consideradas agentes protectores contra patógenos, parásitos y herbívoros (Bell, 1981).

En general estas peptidasas están localizadas en la vacuola, o en la pared celular. Al lesionarse un tejido, las hidrolasas liberadas de las vacuolas rotas constituyen la primera línea de defensa contra potenciales patógenos. La presencia de abundantes peptidasas en algunos frutos como piña, kiwi, papaya y *B. pinguin* podría relacionarse con esta función (Boller, 1986).

El apoplasto de las plantas también forman un medioambiente rico en proteasas, estas son componentes integrales de la respuesta vegetal (Tornero *et al.*, 1997, Jorda *et al.*, 1999, Van Loon y Strien, 1999, Xia *et al.*, 2004). Por ejemplo, la tipo-subtilisina P69B es una Serin proteasa apoplástica relacionada a la patogénesis (PR) de tomate (*Lycopersicum esculentum*) ha sido durante mucho tiempo vinculado a la defensa de la planta (Tornero *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2004). La RCr3-, una Cys proteasa tipo-papaina de tomate, es requerida para la resistencia específica contra el hongo patogénico *Cladosporium fulvum* (Kruger *et al.*, 2002). En Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), la aspártico proteasa extracelular CDR1 funciona en la resistencia a la enfermedad como un regulador positivo de la muerte celular (Xia *et al.*, 2004). Estos hallazgos sugieren que la supresión de las defensas de las plantas mediada por proteasas podría ser una de las diversas

estrategias que los patógenos han evolucionado para colonizar y sobrevivir en la planta.

Guevara et al. (1999), demostraron la primera proteasa bifuncional en plantas (actividad de proteasa y actividad antimicrobiana). Ellos identificaron 3 aspártico proteasas de papa (*Solanum tuberosum*), uno de los tubérculos (StAP1) (Guevara et al., 1999) y dos de las hojas (StAP2 y StPAP3) (Guevara et al., 2001), dos de estas isoformas, StAP1 y StAP3, han sido purificadas y caracterizadas. Ambas proteínas son inducidas por el estrés, tanto biótico y abiótico (Guevara et al., 2001, 2002), tienen una localización extracelular y pueden producir un efecto inhibitorio directo *in vitro* en la germinación de los quistes de *Phytophthora infestans* y conidios de *Fusarium solani* (Guevara et al., 2002, 2004). Adicionalmente ellos demostraron que el efecto antimicrobiano de los StTAP1,2 en contra de *F. solani* y *P. infestans* es causado por una interacción directa con la superficie microbiana, seguido por la permeabilización de la membrana (Mendieta et al., 2006).

Se ha estudiado al grupo de proteasas presentes en el fruto de *B. pinguin*, llamada pinguinaína, que inicialmente fue descrita como una enzima que era activada por grupos reductores que contienen grupos sulfhidrilo, con un pH óptimo entre 3.8-4.3 y es muy resistente a la desnaturalización por temperatura, el análisis de la secuencia de aminoácidos fue similar a la papaína, así como sus propiedades de glicoproteína (Toro-Goyco et al., 1968).

Recientemente se describió la purificación y caracterización de cuatro nuevas endopeptidasa de los frutos de *B. pinguin*, la secuencia amino terminal para las cuatro proteasas mostró que tienen una notable homología con las endopeptidasas de las *Bromeliaceae* y de otras plantas, sus pesos moleculares fue determinado por MALDI-TOF encontrando un rango entre 23,234.637 a 23,639.814 Da (Abreu-Payrol et al., 2008).

Si en la literatura se describen a los proteasas como una proteína polifacética, entonces proponemos que esté grupo de proteínas caracterizado parcialmente en el fruto de *B. pinguin* es una familia de proteínas no explorada que tiene mucho potencial para ser usado como agente antimicrobiano.

6.6 Evaluación de la toxicidad de los extractos de *B. pinguin*, mediante ensayos de actividad hemolítica sobre glóbulos rojos humanos.

El efecto citotóxico de los extractos solubles fue determinado posterior a la aplicación en un Amicon de tamaño de corte de 3 kDa sobre eritrocitos humanos, se obtuvo que para los dos extractos estudiados el porcentaje de hemólisis calculado no excedió el 2%, como puede observarse en la Figura 14. El cálculo se realizó a partir del valor medio de las mediciones de absorbancia de las réplicas. El máximo valor de porcentaje de hemólisis calculado, 1.9 % se obtuvo para el extracto correspondiente a los compuestos \geq a 3 kDa en comparación con 1.49% para los compuestos $<$ a 3kDa (filtrado).

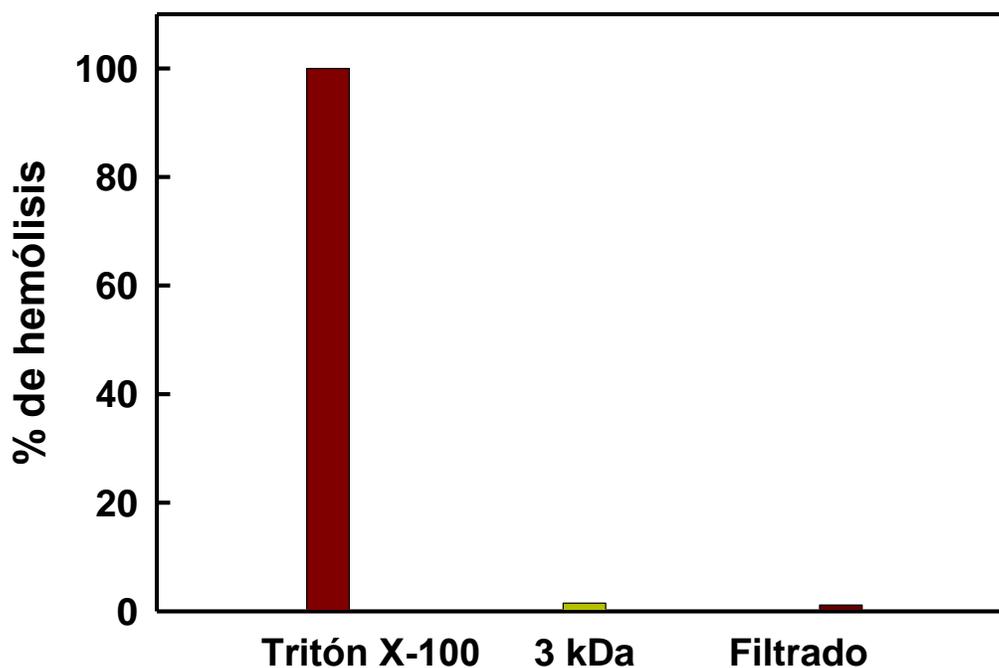


Figura 13. Ensayo de la actividad hemolítica del extracto soluble posterior a la aplicación en un Amicon con tamaño de corte de 3 kDa sobre glóbulos rojos humanos. Tritón X-100 al 0.1% (Control positivo), extracto \geq 3 kDa, 120 μ g (3 kDa), extracto $<$ 3 kDa, 50 μ l (filtrado).

En este estudio se encontró que los extractos no presentaron toxicidad cuando fue evaluada su actividad hemolítica, que si bien es un ensayo *in vitro*, esto permite inferir que en esta especie no existen sustancias capaces de lisis glóbulos rojos. Como muestran los resultados, con ambos extractos los valores de porcentaje de hemólisis obtenidos son inferiores al 10%, valor máximo permisible para considerar que un compuesto con actividad biológica probada sea inocuo.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se puede concluir:

1. El pH del amortiguador no influyó en la extracción de las proteínas totales contenidas en frutos y semillas de *B. pinguin*.
2. Los extractos proteicos del fruto de *B. pinguin* contiene una marcada actividad antimicrobiana contra dos patógenos importantes en humanos (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*). Esta actividad parece estar asociada a la fracción soluble de la preparación. Adicionalmente se determinó que los compuestos responsables de dicha actividad son termoestables ya que al ser tratados a 100° C durante 30 minutos conservaron su actividad antimicrobiana.
3. La preparación (extracto proteico) obtenida a partir de semillas de *B. pinguin* no presentó actividad antimicrobiana contra las bacterias ensayadas en este estudio.
3. La concentración mínima inhibitoria (CMI) para las cepas ATCC tuvo valores de 0.492 mg/ml para ambos (*E. coli*, *S. aureus*) y de 0.984 mg/ml para *P. aeruginosa*.
4. La purificación parcial mediante cromatografía de filtración en gel y unidades de filtración con tamaño de corte de 3 kDa mostró que actividad antimicrobiana está dada tanto por compuestos mayores a 3 kDa como compuestos menores a 3 kDa, estos últimos podrían ser compuestos del metabolismo secundario.
5. El ensayo de autobiografía sobre gel demostró que la actividad antimicrobiana está dada por proteínas de peso molecular mayor a 200 kDa y el ensayo en gel conteniendo gelatina como sustrato sugiere que puede tratarse de proteasas.
6. La actividad hemolítica ensayada sobre glóbulos rojos indica que los extractos no presentaron toxicidad, sugiriendo que son compuestos inocuos.

7. Finalmente los resultados obtenidos en este estudio nos dan la base para posteriores investigaciones sobre el aislamiento y caracterización de los compuestos que imparten esta actividad biológica, indicando que en el fruto de *B. pinguin* contienen tanto componentes proteicos, así como metabolitos secundarios con gran potencial para ser utilizados en la industria farmacéutica.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu-Payrol, J. y Miranda, M. (2000). Estudio farmacognóstico de *Bromelia pinguin* L. (Piña de ratón). *Rev Cubana Farm.* 34(3):181-6.
2. Abreu-Payrol, J.; Miranda, M. y Lora, J. (2001b). Extracto etéreo de frutos de *Bromelia pinguin* L. (Piña de ratón) por el sistema de acoplado CG-EM. *Rev Cubana Farm.* 35(1):51-55.
3. Abreu-Payrol, J.; Miranda, M.; Toledo, G. y Castillo, O. (2001a). Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin*. *Rev Cubanana Farm.* 35(1):56-60.
4. Abreu-Payrol, J; Obregón, W.D.; Natalucci, C.L.; Caffini, N.O. (2005). Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit. *Fitoterapia.* 76:540-540.
5. Anand, A., Lei, Z., Sumner, L. W., Mysore, K. S., Arakane, Y., Bockus, W. W. and Muthukrishnan, S. (2004). Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:1306-1317.
6. Bell, A. (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32:21-88.
7. Benavides-Plascencia, L, Aldama, O.A.L., Vázquez, H.J. (2005). Vigilancia de los niveles de uso de los antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la ciudad de México. *Salud Publica Mex.* 44(3):219–226.
8. Black, R. J., and Dehgan. (1993). B. Bromeliads. Florida Cooperative Extension Service, Circular 1090. <http://edis.ifas.ufl.edu/MG272>. 1993.
9. Bohlmann, H. and Apel, K. (1991). Thionins. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant.Mol.Biol.* 42:227-240.
10. Boller, T. (1986). Roles of proteolytic enzymes in interaction of plant and other organisms. In: Dalling MJ (Eds.), *Plant Proteolytic Enzymes*, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, pp. 67-96.

11. Boman, H. G. (1996). Peptide antibiotics: Holy or Heretic Grails of innate Immunity? *Scand J Immunol.* 43:475-482.
12. Boman, H. G. (2000). Innate immunity and the normal microflora. *Immunological Reviews.* 173:5-16.
13. Boman, H.G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med.* 3:197-215.
14. Bradford, M.M. (1976). Rapid and Sensitive method For the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochem.* 72:248-254.
15. Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G.W., Osborns, R.W. (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 297-323.
16. Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P., Osborn, R.W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108:1353-1358.
17. Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3:238-250.
18. Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers of metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 3:238-250.
19. Camacho-Hernández, I.L.; Chávez-Velázquez, J.A.; Uribe-Beltrán, M.J.; Ríos-Morgan, A.; Delgado-Vargas F. (2002). Antifungal activity of fruit pulp extract from *Bromelia pinguin*. *Fitoterapia.* 73:411-413.
20. Carmona, M.J., Molina, A. Fernandez, J.A., Lopez-Fando, J.J., García-Olmedo, F. (1993). Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J.* 3:457-462.
21. Castle, M., Nazarian, A., Yi, S.S., Tempst, P. (1999). Lethal effects of *aphidaecin* on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *J Biol Chem.* 274:32555-32564.

22. Castro, M. S. and Fontes, W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters* 12(1): 11-16.
23. Cervantes, V. (1889) *Ensayo a la material médica vegetal de México*. Oficina tipográfica de la Secretaría de Fomento.
24. Cichewicz, R.H., Thorpe, P.A. (1999). The antimicrobial properties of chile peppers (*capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *J Ethno-pharmacol.* 52:61-70.
25. Coe, F.G. and Anderson, G.J. (1996). Screening of medicinal plants used by the Garifuna of eastern Nicaragua for bioactive compounds, *J. Ethnopharmacol.* 53, 29.
26. Colgrave, M.L. and Craik. D.J. (2004). Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry.* 43(20):5965-5975.
27. Colilla, F.J. y Rocher, A.M.E. (1990). γ -purothionins: aminoacid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.* 270:191-194.
28. Cordoba Alva, F., Pérez-Campos, E. and Magaña, P. (2000). *Flora Neotropica. Bromeliaceae.* CRC Press LLC. Monogr 21. pp.1493-1979.
29. Craik, D.J. (2006). Seamless proteins the up their loose ends. *Science.* 311:1563-1564.
30. Craik, D.J., Daly, N.L., Bond, T., Waine, C. (1999). Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J Mol Biol* 294:1327–1336.
31. Croteau R, Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* eds Buchanan B, Grissem W, Jones R (American Society of Plant Biologists, Rockville, MD), pp 1250–1268.
32. Cruz, J.M., Domínguez, J.M., Dominguez, H., Parajo, J.C. (2001). Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *J Agric Food Chem.* 49:2459-2464.

33. Chandrashekar, A. and Satyanarayana, K. V. (2006). Disease and pest resistance in grains of sorghum and millets. *J. Cereal Sci.* 44: 287-304.
34. Dassanayake, R.S., Silva Gunawardene, Y.I., Tobe, S.S. (2007). Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized alpha/beta motifs. *Peptides*;28:62-75.
35. Edwards, R., and Gatehouse, J.A. (1999). Secondary metabolism. Pp. 193-218. In: P.J. Lea., and R.C. Leegood (eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons Ltd. Maryland, USA. 384 p.
36. Escobar, R. (1980). *Enciclopedia Agrícola de Conocimientos Afines*. Ed. Popol Vuh, Tomo III. pp. 34, 35, 149.
37. Faucon, P. (1998). Pinguin, Piñuela. (En red). Disponible en http://www.deserttropicals.com/Plants/Bromeliaceae/Bromelia_pinguin.html.
38. Florack, D.A.A. and Stiekema, W.J. (1994). Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Molecular biology*. 26:25-37.
39. Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Tereda, S., Nomura, T. (2002). Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*. 73:536-539.
40. García, F., Rodríguez, P., Molina, A., Alamillo, J.M., López, E., Berrocal, M. y Poza C. (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Lett.* 2-3:219-222.
41. García-Olmedo F., Molina A. Segura A. and Moreno M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer protein in plants. *Trends Microbiol.* 3: 72-74.
42. Gelly, J.C., Gracy, J., Kaa, Q., Le-Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L. (2004). The KNOTTIN website and database: a new information system dedicated to the knottin scaffold. *Nucleic Acids Res.* 32:156-159.

43. Gianinazzi, S., Martin, C. and Vallee, J. C. R. (1970) Hypersensitivity to viruses, temperature and soluble proteins in *Nicotiana Xanthi n.c.* Appearance of new macromolecules at the repression of viral synthesis. C R Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. 270:2383-2386.
44. Guevara, M. G., Daleo, G. R. & Oliva, C. R. (2001). Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiol Plant.* 112:321–326.
45. Guevara, M. G., Oliva, C. R., Huarte, M. & Daleo, G. R. (2002). An aspartic protease with antimicrobial activity is induced after infection and wounding in intercellular fluids of potato tubers. *Eur J Plant Pathol.* 108: 131–137.
46. Guevara, M. G., Oliva, C. R., Machinandiarena, M. & Daleo, G. R. (1999). Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase. *Physiol Plant.* 106:164–169.
47. Guevara, M. G., Veríssimo, P., Pires, E., Faro, C. & Daleo, G. R. (2004). Potato aspartic proteases: induction, antimicrobial activity and substrate specificity. *J Plant Pathol.* 86:233–238.
48. Hammami, R., Hamida, B.J., Vergoten, G. and Fliss, I. (2009). PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research* 37:963–968.
49. Hancock, R.E., Sahl H.G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 24:1551-1557.
50. Hancock, R.E.W. y Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett.* 2:143-149.
51. Hancock, R.E.W. y Scott, M.G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defense. *Proc. Natl Acad Sci.* 16:8856-8861.
52. Hoffmann, J.A.; Kafatos F.C.; Janeway Jr C. A. and Ezekowitz R.A.B. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science.* 284(5418): 1313-1318.

53. Jorda, L., Coego, A., Conejero, V., Vera, P. (1999) A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *J Biol Chem.* 274: 2360–2365.
54. Kader, J.C. (1996). Lipid-transfer proteins plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 627-654.
55. Kruger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M., Tang, S., Mulder, L., Jones, J.D. (2002). A tomato cysteine protease required for Cf-2- dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science.* 296: 744–747.
56. Laemmli U. (1970). Cleavage Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T.⁴ *Nature.* 227:680-685.
57. Lanfi, L. (1976). Análisis Técnico sobre el aprovechamiento del Henequén. Centro Mexicano de información Química
58. Lay, F.T., Anderson, M.A. (2005). Defensins-components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 6: 85-101.
59. Loeza-Ángeles, H., Sagrero-Cisneros, E., Lara-Zárate, L., Villagómez-Gómez, E., López-Mesa, J.E. y Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Expression of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* in endothelial cell with antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotech Lett.* 30:1713-1719.
60. Méndez, E.; Moreno, A.; Colilla, F.; Pelaez, F.; Limas, G.G.; Méndez, R.; Soriano, F.; Salinas, M. y de Haro, C. (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukariotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm. *Eur.J.Biochem.* 194:533-539.
61. Mendieta, J.R., Pagano, R.R., Muñoz, F.F., Daleo, G.R., Guevara, M.G. (2006). Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology.* 152:2039-2047.
62. Meyer, B., Houlne, G., Pozueta-Romero, J., Schantz, M.L., Schantz, R. (1996). Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell

- pepper. Upregulation during ripening and upon wounding. *Plant physiol.* 112:615-622.
63. Michaud, D. (1998). Gel Electrophoresis of Proteolytic Enzymes. *Analytica Chimica.* 372:173-185.
64. Miskovsky, P. (2002). Hypericin- A new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Curr Drug Targets.* 3:55-84.
65. Mulvenna, J.P., Wang, C. and Craik, D.J. (2006). CyBase: a database of cyclic protein sequence and structure. *Nucleic Acids Research* 34:192–194.
66. Muthukrishnan, S., Liang, H. G., Trick, N. H. and Gill, S. B. (2001). Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell Tiss. Org.* 64:93-114.
67. Nicolas, P. (2009). Multifuntional host defense peptides:intracellular-targeting antimicrobial peptides. *The FEBS J.* 22:6483-6496.
68. Novelo Cuello Carlos G. (1994). La Fruticultura Yucateca. Centro Regional Universitario de la península de Yucatán. 1ª Edición (10) p. 20.
69. Ogata, K., Linzer, B.A., Zuberi, R.I., Ganz T. y Cantanzaro, S. (1992). Activity of defensins of human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun.* 11:4720-4725.
70. Ortiz de Montellano B. (1975). Empiric aztec Medicine. *Science, New Series.* 188(4185). p.p 215-220.
71. Os, L., Lee, B., Park, N., Koo, J.C. Kim, Y.H., Prasad, D.T., Karigar, C., Chun, H.J., Jeong, B.R., Kim, D.H., Nam, J.G., Kwak, S.S., Cho, M.J., Yun, D.J. (2003). Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Phytochem.* 62(7):1073-1079.
72. Osbourn, AE. (1996). Prefomed antimicrobial compounds and plant defense agains fungal attack. *The Plant Cell.* 8: 1821-1831.
73. Papo, N. Y Shai, Y. (2005). Host defense peptides as new weapons in cáncer treatment. *Cell Mol Life Sci.* 7-8:784-790.

74. Pío-León, J.F.; López-Angulo, G.; Paredes-López, O.; Uribe-Beltrán, M.; Díaz-Camacho, S.P.; Delgado-Vargas, F. (2009). Physicochemical, Nutritional and Antibacterial Characteristics of the Fruit of *Bromelia pinguin* L. *Plant Foods Human Nutr.* 64:181-187.
75. Plantencyclo.com (Modificado 22-01-04). Las bromeliáceas. (En red).
Disponible en:
http://www.plantencyclo.free.fr/sp/bromel_general_gg.html
76. Raffauf, R.F., Menachery M.D., Le Quesne P.W., Arnold E.V., Clardy, J. (1981). Antitumor plants. 11. Diterpenoid and flavonoid constituents of *Bromelia Pinguin* L. *J Org Chem.* 46(6):1094-8.
77. Risso, A. (2000). Leukocyte antimicrobial peptides: Multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol.* 6:785-792.
78. Schultes, R.E. (1978). The Kindom of plants. En: Thomson, W.A.E. (Ed.). *Medicines from the Earth.* McGraw-Hill Book Co., New York; 208.
79. Schwalbe, R.; Steele-Moore, L. & Goodwin, Eds. Taylor & Francis Group. (2007). *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols.* 275-282.
80. Segura, A., Moreno, M., Molina, A. y García-Olmedo F. (1999). Novel defensin subfamily from spinach (*spinacia oleracea*). *FEBS Lett.* 2-3:159-162.
81. Sellitrenikoff, C.P. (2001). Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 67(7):2883-2894.
82. Shao, F., Hu, Z., Xiong, Y.M., Huang, Q.Z., Wangcg, Zhu, R.H., Wang, D. C. (1999). A new antifungal peptide from the seeds of *phytolacca Americana*: characterization, amino acid sequence and cDNA cloning. *Biochem. Biophys Acta.* 1430(2):262-268.
83. Spelbrink, R.; Dilmac, N.; Alen, A.; Smith, T.J.; Shah, D.M. y Hockerman, G.H. (2004). Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiology* 135:2055-2067.

84. Tam, J.P., Lu, Y.A., Yang, J.L., Chiu, K.W. (1999). An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystein-knot disulfides. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 96(16):8913-8918.
85. Terras, F.R.G.; Schoofs, H.M.E.; De Bolle, M.F.C. y Van Leuven, F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from Radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J.Biol.Chem.* 267:15301-15309.
86. Terras, F.R.G.; Torrekens, S.; Van Leuven, F.; Osborn, R.W.; Vanderleydeen, J.; Cammue, B.P.A. y Broekaert, W.F. (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.* 316:233-240.
87. Thevissen, K.; Osborn, R.W.; Acland, D.P. y Broekaert, W.F. (1997). Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J.Biol.Chem.* 272:32176-32181.
88. Thomma, B.P.; Cammue, B.P.A. y Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta* 216:193-202.
89. Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., Kamoun, S. (2004). A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem.* 279: 26370–26377.
90. Tornero, P., Conejero, V., Vera, P. (1997). Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *J Biol Chem.* 272: 14412–14419.
91. Toro-Goyco, E.; Maretki, A; Matos, M.L. (1968). Isolation, purification, and partial characterization of pinguain, the proteolytic enzyme from *Bromelia Pinguin*. *Arch Biochem Biophys.* 126(1):91-104.
92. van Loon, L. C. and van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology.* 40:199-211.

93. van Loon, L. C. and van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97.
94. van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T. and Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12:245-264.
95. van Loon, L. C., Rep, M. and Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopath.* 44:135-162.
96. van Loon, L.C., van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol.* 55: 85–97.
97. Velázquez-Meza, M.E. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Publica Mex* 47(5):381–387.
98. Vernon, L.P.; Evett, G.C.; Zeikus, R.D. y Gray, W.R. (1985). A toxic thionin from *Pyruha pubera*: purificación, propiedades, and amino acid sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* 238:18-29.
99. Vigers, A.J., Walden, K.R., and Selitrennikoff, C.P. (1991). A New Family of Plant Antifungal Proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 4(4):315-323.
100. Wang, C.K.L., Kaas, Q., Chiche, L. and Craik, D.J. (2008) CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic Acids Research* 36:206-210.
101. Warhurst, D.C. (1981). Cinchona alkaloids and malaria. *Lancet.* 2:1346-1347
102. Wink, M. (1999). Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. In: M. Wink M. (Ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK 374 p.

103. Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R.A., Lamb, C. (2004). An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. EMBO J. 23: 980–988.
104. Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A.A., Algur, O.F., Bilaloglu, V. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea Desf ex DC*), sage (*Salvia triloba L*) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. J Agric Food Chem. 48:5030-5034.
105. Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 415: 389-395.
106. Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.L., Schaller, A., He, S.Y., Howe, G.A. (2003). Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway Plant J. 36: 485–499.