



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Extractos proteicos con actividad antimicrobiana.

Extracción, precipitación y evaluación de actividad.

Br. Matías Maidana

Tutor: Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza

Co-Tutor: PhD. Andrea Villarino

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS-UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

INDICE

1. Resumen.....	6
2. Introducción	7
2.1. ¿Cómo invaden los patógenos a las plantas?.....	8
2.2. ¿Cómo se defienden las plantas?.....	10
2.2.1. Defensa estructural pre-existente	11
2.2.2. Defensa bioquímica pre-existente	13
2.2.3. Reconocimiento de patógenos.....	15
2.2.4. Defensas que se activan en respuesta a las infecciones.	18
2.3. Utilización de extractos de plantas como controladores biológicos.....	22
2.4. Patógenos seleccionados para ser empleados en los ensayos de inhibición utilizando extractos proteicos.....	23
3. Objetivo	24
3.1. Objetivos específicos:.....	24
4. Materiales y métodos	25
4.1. Material vegetal	25
4.2. Extracción proteica.....	26
4.3. Precipitación proteica	26
4.4. Diálisis y liofilizado	27
4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (TRICINE-SDS-PAGE)	27
4.6. Microorganismos testeados.....	28
4.7. Determinación de la actividad antimicrobiana.	29
4.7.1. Bioensayo de difusión en placa	29
4.7.2. Determinación del porcentaje de inhibición, la mínima concentración inhibitoria (MIC) y la mínima concentración fungicida (MFC).....	29
5. Resultados y Discusión	31
Caracterización de los extractos y evaluación del potencial inhibitorio de los mismos.....	31
6. Conclusiones.....	39
7. Perspectivas	40
8. Bibliografía	41

Listado de Tablas

Tabla 1. Mecanismos de resistencia de las plantas (Adaptada de González Fernández (2003))	11
Tabla 2: Semillas de especies vegetales utilizadas	25
Tabla 3: Recuperación de proteínas luego de precipitación con acetona utilizando semillas de Arazá.	31
Tabla 4: Datos de MIC para cada semilla evaluada	36
Tabla 5 Valores de actividad fungicida de las semillas evaluadas	38

Listado de Figuras

Figura 1: Esquema de estomas de planta de puerro, extraído de de Agrios 1997	12
Figura 2: esquema de principales metabolitos secundarios y sus principales precursores extraído de Taiz 2005.	13
Figura 3: Electroforesis SDS-PAGE 16%-Tricina del extracto de Arazá, A- Marcador de Peso Molecular <i>Peptides</i> (Biorad). B- 40 µg de extracto crudo. C- 40 µg de 1V. D- 40 µg de 6V.	32
Figura 4: Ensayo de inhibición extractos de Adesmia en PDA con esporas de <i>F.oxysporum</i> , 1- Captan 0,2mg/mL. 2- extracto 1V a 2mg/ml. 3- extracto crudo a 2mg/ml. 4- extracto 6V volúmenes a 2mg/ml 5- H ₂ O mQ	32
Figura 5: Ensayo de inhibición extractos de Arazá en PDA con esporas de <i>F.oxysporum</i> , 1- Captan 0,2mg/mL. 2- Extracto 1V a 2mg/ml. 3. Extracto 6V a 2mg/ml 4- extracto crudo a 2mg/ml 5 H ₂ O mQ	32
Figura 6: Izquierda ensayo para la determinación del MIC. Extractos de pitanga contra <i>F.oxysporum</i> . En pocillos A1-A6 control de crecimiento.; A7-A9 Captan 0,2mg/mL; B1-B3 Extracto crudo 1mg/mL; B4-B6 Extracto 1V a 1mg/mL. B7-B9 Extracto 6V. Pocillos de C a la H diluciones al medio del la fila B. Derecha Gráfico de dosis respuesta a tiempo final 48 hs. Extractos de pitanga contra <i>F.oxysporum</i> .	34
Figura 7: Izquierda ensayo para la determinación del MIC. Extractos de Ubajay contra <i>F.oxysporum</i> . En pocillos A1-A6 control de crecimiento; A7-A9 Captan 0,2mg/mL; B1-B3 Extracto crudo 1mg/mL; B4-B6 Extracto un volumen 1mg/mL. B7-B9 Extracto seis volumen 1mg/mL. Pocillos de C a la H diluciones al medio del la fila B. Derecha gráfico de dosis respuesta a tiempo final 48 hs con extractos de Ubajay contra <i>F.oxysporum</i> .	35
Figura 8: Izquierda ensayo para la determinación del MIC. Extractos de Arroz negro contra <i>F.oxysporum</i> . En pocillos A1-A6 control de crecimiento; A7-A9 Captan 0,2mg/mL; B1-B3 Extracto crudo 1mg/mL; B4-B6 Extracto un volumen 1mg/mL. B7-B9 Extracto seis volumen 1mg/mL. Pocillos de C a la H diluciones al medio del la fila B. Derecha Gráfico de dosis respuesta a tiempo final 48 hs. Extractos de Arroz negro contra <i>F.oxysporum</i>	35
Figura 9 Ensayo de MFC para extractos de Arroz negro contra <i>F.oxysporum</i> . A-control de crecimiento; B 20µL de pocillos B-8; C 20µL de pocillos C-8; D 20µL de pocillosD-8.	37

Listado de Abreviaturas

1v	Un volumen
6v	Seis volúmenes
AJ	Ácido Jasmónico
AS	Ácido Salicílico
EC	Extracto Crudo
Et	Etileno
FAO	Food and Agriculture Organization
HCl	Ácido Clorhídrico
MAMPS	Patrones Moleculares Relacionados a Microbios
MFC	Mínima Concentración Fungida
mg	miligramos
MIC	Mínima Concentración Inhibitoria
mL	Mililitros
N ₂	Nitrógeno molecular
NaCl	Cloruro de Sodio
NaClO	Hipoclorito de Sodio
PAM	Péptidos Antimicrobianos
PAMPS	Patrones Moleculares Relacionados a Patógenos.
PDA	Potato Dextrosa Agar
PDB	Potato Dextraosa Broth
PBI	Producto Interno Bruto
RRL	Repeticiones Ricas en Leucina
RRP	Receptores de Reconocimiento de Patrones
SAGPyA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
mg	microgramos
µL	microLitros

1. Resumen

En la Unidad de biotecnología de INIA Las Brujas se desarrolla un proyecto de investigación en moléculas con actividad antimicrobiana como una alternativa frente control de patógenos. Este tiene tres componentes fundamentales: identificación y purificación de péptidos antimicrobianos, caracterización *in vitro/in vivo*, y escalado en la producción de péptidos antimicrobianos. El presente trabajo se centró en el diseño y planificación de una metodología simple y de bajo costo para la obtención de extractos proteicos de bajo peso molecular provenientes de semillas como aproximación a la identificación de nuevos péptidos antimicrobianos. Las semillas evaluadas fueron: *Coriandrum sativum*, *Psidium cattleianum Sab*, *Adesmia spp*, *Ornithopus spp*, *Eugenia uniflora*, *Hexachlamis edulis*, *Trifolium pratense L*, *Anethum graveolens*, *Oryza sativa* y *Paspalum notatum*. Los patógenos seleccionados fueron *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, y *Pseudomonas syringae*. Con las muestras de los extractos proteicos obtenidos se procedió a la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana. Se realizaron modificaciones en la metodología de ensayo de difusión en PDA para la evaluación de inhibición, que permitió evitar la posible interacción con los discos de papel (metodología reportada) y fundamentalmente ser más eficiente en la evaluación directa del extracto/fracción peptídica. Se determinó la mínima concentración inhibitoria (MIC) y Mínima Concentración Fungicida (MFC) de aquellas fracciones activas. Se observó inhibición en la mayoría de los extractos crudos frente a *F. oxysporum*, pero solo los extractos seis volúmenes de *Adesmia spp*, *O. sativa*, *H. edulis* y *P. cattleianum* inhibieron el crecimiento de dicho patógeno, presentando valores MIC de 250µg/mL, 125µg/mL, 125µg/mL y 125µg/mL respectivamente. Tanto *O.Sativa* como *Adesmia spp* presentaron actividad fungicida de *F. oxysporum* con un valor MFC de 250ug/mL y 125ug/mL respectivamente. De la misma manera *Adesmia spp*, *P.cattlaianum sab.*, *O. pinnatus*, *H.edulis* y *O.sativa* presentaron un MIC de 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 31,25 µg/mL y 125 µg/mL contra *P. digitatum* y *P. italicum* respectivamente. Por otro lado los extractos 6V de *O. sativa*, *O. pinnatus*, *E. uniflora* y *H. edulis* presentaron actividad inhibitoria contra *P. syringae* con un MIC de 125 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL y 125 µg/mL respectivamente donde todos los extractos menos *O. sativa* mostraron tener actividad fungicida. Por último *O. pinnatus* *E. uniflora* y *H. edulis* mostraron actividad inhibitoria contra *P.syringae* a 125µg/mL. Estos resultados son útiles en la definición de qué semillas son las mejores candidatas para la purificación y caracterización de péptidos con potencial actividad antimicrobiana con futura aplicación biotecnológica.

2. Introducción

El control de plagas es de suma importancia en la producción agrícola ya que de este depende gran parte el rendimiento de la producción y la calidad del producto final, siendo la producción agraria la base de un gran mercado mundial que se encuentra influenciado, directa o indirectamente por productos de origen vegetal (alimentos, textiles, maquinaria agraria, etc). Las causas más frecuentes del crecimiento deficiente de las plantas y la destrucción de cosechas son los fitopatógenos, malezas y plagas de insectos. (Agrios *et al.*, 2005).

El rendimiento de la producción agrícola puede verse afectado por varios motivos dentro de los que se destaca:

- I- Disminución de la producción cuantitativamente a causa de las enfermedades en el campo, como es el caso de la mayoría de las enfermedades de las plantas.
- II- Disminución de la calidad del producto debido a manchas, roñas o pústulas que se producen sobre frutos y hortalizas como resultado de una infección que no afectan la producción pero si la calidad del producto final y esto se traduce en pérdida económica.
- III- Pérdida por las enfermedades que se producen durante post-cosecha, como ocurre con la pudrición de los frutos, hortalizas, semillas y fibras almacenadas.

El 17 de septiembre 2014, *Food and Agriculture Organization* publicó un informe donde analiza el costo de las pérdidas en post-cosecha indicando que cada año, el 30 por ciento de la producción mundial de alimentos se pierde después de la cosecha. Según los estudios realizados esto representa 750 mil millones de dólares en términos de los precios al productor cada año. Esto es 17 veces nuestro producto bruto interno (FAO 2014).

Los hongos fitopatógenos son los principales agentes infecciosos en plantas, causando alteraciones post-cosecha, y problemas de calidad relacionados con el aspecto, valor nutricional, características organolépticas y conservación de frutas y hortalizas. Existe una gran variedad de géneros de hongos causantes de pérdidas tanto en el campo durante el cultivo como en las posteriores etapas de recolección, almacenamiento y distribución, ya sea el órgano aprovechable, fruto, tallo, hojas, raíces o tubérculos de la planta (Agrios, 2005). En algunos casos, directa o

indirectamente, son los responsables del desarrollo de trastornos patológicos, alérgicos o tóxicos en los consumidores debido a la producción de micotoxinas o alérgenos que contaminan los productos vegetales. Este es el caso de determinadas especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, capaces de originar intoxicaciones por patulinas (clariformina o leucipina, producidas por *Penicillium expansum* o *Penicillium griseofulvum*) o aflatoxinas (producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*) (Moss *et al.*, 2002; Peraica *et al.*, 1999).

Con el fin de mitigar las pérdidas causadas por los fitopatógenos, los productores recurren al uso intensivo de pesticidas de síntesis química. Sin embargo, su utilización presenta grandes problemas, ya que al no ser específicos contra una clase particular de organismos debido en general al modo de acción, han generado daños considerables tanto a la ecología, como a los organismos superiores. De la misma manera el uso excesivo de agroquímicos acarrea el problema de la aparición de cepas resistentes (Oerke *et al.*, 2006). Por último es de particular interés que muchos de los mercados internacionales demandan productos sin residuos de pesticidas. (Rekha *et al.*, 2006, SAGPyA, 2007). Este escenario nos obliga explorar mecanismos alternativos de control de patógenos que nos permitan sortear las barreras que los pesticidas de síntesis química presentan, buscando mecanismos naturales que tengan una elevada selectividad y que además, en las condiciones en las que el producto se ingiere, no presenten toxicidad contra los humanos o contra los animales. Las plantas han generado con la evolución una serie de sistemas de defensa contra el ataque de patógenos basados en barreras estructurales o generando una respuesta metabólica activa. (Blanco-Labra *et al.*, 2002).

2.1. ¿Cómo invaden los patógenos a las plantas?

Para que un patógeno infecte una planta, debe ser capaz de abrirse paso al interior de ésta, obtener sus nutrientes y neutralizar sus reacciones de defensa. Los patógenos logran infectar a las plantas principalmente a través de la secreción de compuestos químicos que afectan a ciertos componentes o mecanismos metabólicos de sus hospedantes (Agrios, 2005).

La interacción planta-patógeno es un proceso dinámico en el que ambos intervienen. Cada patógeno ha evolucionado de una forma distinta en cuanto al modo en que invade a su huésped, y

la existencia de distintas barreras de defensa en la planta junto con las condiciones ambientales presentes en un determinado momento, condicionan el éxito del patógeno en cuanto a su colonización y proliferación. Los patógenos utilizan diferentes estrategias de invasión durante el proceso de infección. Puede ser por penetración mecánica y/o penetración mediante la secreción de determinadas sustancias (Agrios, 2005).

Las sustancias secretadas contribuyen a facilitarle el pasaje a través de las barreras físicas presentes en las plantas. Esto les permite obtener los nutrientes necesarios para su proliferación y promover la neutralización de las respuestas de defensa vegetales (Castro *et al.*, 2005). Dentro de estas sustancias tenemos:

- I- enzimas hidrolíticas que degradan los componentes estructurales de la pared celular del huésped, permitiendo su penetración (Castro *et al.*, 2005).
- II- toxinas capaces de alterar la permeabilidad de la membrana celular, y de interferir con las funciones metabólicas del huésped interrumpiendo ciertas vías metabólicas esenciales (Castro *et al.*, 2005). Las toxinas se pueden clasificar en toxinas que afectan a un amplio rango de hospederos o toxinas específicas de hospederos.
- III- reguladores de crecimiento (auxinas, etileno, giberelinas, entre otros) que promueven un desbalance en el sistema hormonal del huésped, causando respuestas fisiológicas incompatibles con el patrón de desarrollo normal de la planta (Castro *et al.*, 2005).
- IV- polisacáridos responsables del bloqueo de mecanismos de translocación de agua a través del sistema vascular (Castro *et al.*, 2005).

Entre las clases de sustancias secretadas por patógenos, es útil remarcar la importante contribución de enzimas hidrolíticas para la diseminación del patógeno. Entre las enzimas hidrolíticas producidas por el patógeno durante la invasión del tejido huésped se encuentran:

- I. Cutinasas: enzimas capaces de degradar cutina, uno de los principales compuestos de la cutícula de las plantas. Varios hongos presentan una producción basal de cutinasas, las cuales en contacto con el sustrato (cutina) promueven su hidrólisis, liberando monómeros que a su vez inducen la expresión y producción de cutinasas por el hongo, intensificando el proceso invasivo. El rol fundamental de estas enzimas es pre-ablandar los tejidos del

hospedero, facilitando la penetración del agente (González *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2005).

- II. Pectinasas: enzimas capaces de degradar componentes pectínicos de las paredes celulares vegetales, entre las que encontramos poligalacturonasas, pectinliasas y pectinmetilesterasas. La degradación de la pectina trae como consecuencia la pérdida de la estructura del tejido vegetal (González 2000; Castro *et al.*, 2005; Agrios, 2005).
- III. Celulasas, hemicelulasas y ligninasas: las cuales promueven la degradación final de la pared celular, permitiendo en varios casos, la instalación y diseminación del patógeno (Castro *et al.*, 2005).

2.2. ¿Cómo se defienden las plantas?

Las plantas no poseen un sistema de defensa con células especializadas capaces de montar una respuesta humoral específica como es el caso del sistema de la inmunidad adaptativa de los vertebrados. Sin embargo poseen una línea de defensa análoga a la inmunidad innata de animales con receptores de patrones moleculares asociados a patógenos y moléculas efectoras, que en general permiten contrarrestar el ataque de los patógenos ya sea por la presencia de moléculas preexistentes, o por la inducción de genes responsable de desarrollar una respuesta relacionada a la patogénesis (Tabla 1) (González 2003). A su vez la combinación de características estructurales y la respuesta inducida difieren en las distintas interacciones planta-patógeno, edad de la planta, órgano o tejido involucrado y el estado nutricional de la planta (Agrios, 2005).

Tabla 1. Mecanismos de resistencia de las plantas (adaptada de González (2003))

Barreras	Preexistentes	Inducidas
Físicas	<ul style="list-style-type: none"> -Pared celular -Cutícula -Otros(estomas, lenticelas) 	<ul style="list-style-type: none"> -Lignificación -Muerte de la célula huésped (necrosis) -Inducción de lipooxigenasa e hidrolasas -Formación de papilas (callosidades) -Oclusión de vasos -Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina
Bioquímicas	<p>Componentes antimicrobianos:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Glucósidos cianogénicos (ác. hidrociánico) -Terpenoides (saponinas, cucurbitacinas) -Compuestos fenólicos (cumarinas, tanino, flavonoides, ligninas) -Ácido hidroxámico - Péptidos/proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> -Formación de fitoalexinas: fenoles, terpenoides, poliacetilenos, derivados de ácidos grasos -Ácido salicílico (activación genes) -Proteínas relacionadas con la patogénesis: proteínas de resistencia sistémica (PRS)

2.2.1. Defensa estructural pre-existente

Para causar una infección los patógenos deben adherirse y atravesar la superficie de las plantas, la primera línea de defensa. Algunas de las defensas estructurales se encuentran en la planta antes que tenga contacto con el patógeno, ya que por lo general son estructuras que limitan el ambiente externo del medio interno de la planta y la protegen de la pérdida de agua como por ejemplo la pared celular o la cutícula.

La pared externa está compuesta mayoritariamente por celulosa, donde su grosor y dureza en las células epidérmicas juega un rol importante en la resistencia de algunas plantas ante el ataque de ciertos patógenos. Las paredes gruesas y firmes de las células epidérmicas hacen que la penetración directa de los hongos patógenos sea difícil o imposible (Agrios, 2005).

La cutícula es una estructura de varias capas segregada por células epidérmicas que recubre la superficie externa de la pared celular. Esta se divide en tres capas donde la más externa está compuesta por ceras, la porción media por cutina y la más interna por pectina y celulosa (Taiz *et al.*, 2005). Un ejemplo claro de esto es la cantidad y calidad de ceras que se suelen depositar sobre frutos y hojas brindándoles un carácter hidrofóbico a la superficie del órgano. Esto evita que se forme una película de agua en la que los patógenos pudieran depositarse y germinar. Las ceras, por ejemplo, son un indicador de calidad de frutos en el mercado de arándanos (Agrios, 2005; SAGPyA 2007).

Los estomas y lenticelas son pequeños orificios que atraviesan la epidermis y permiten el intercambio gaseoso de las plantas con el medio. Los estomas regulan el intercambio gaseoso según el estado hídrico de la planta, donde las células oclusivas que rodean el ostiolo tienen la capacidad de variar su forma y tapar el poro en función de su estado (Figura 1). Aun cuando la mayoría de los patógenos penetran en las plantas a través de sus estomas cerrados, algunos de ellos como la roya del tallo del trigo, pueden penetrar en las plantas sólo cuando sus estomas están abiertos. Debido a esto, algunas variedades de trigo (en las que los estomas se abren al atardecer), son resistentes gracias a que los tubos germinativos de las esporas que germinan durante la noche desecan el rocío, lo cual hace que éste se evapore antes de que los estomas se abran. El tipo de estructura de los estomas, por ejemplo, la presencia de un orificio bastante estrecho y de amplias células oclusivas pronunciadas, puede conferir también una cierta resistencia a ciertas variedades contra el ataque de algunos patógenos (Taiz *et al.*, 2005; Agrios, 2005). Estos factores en conjunto pueden ayudar a determinar cierto grado de resistencia al ataque de estos patógenos (Agrios, 2005).

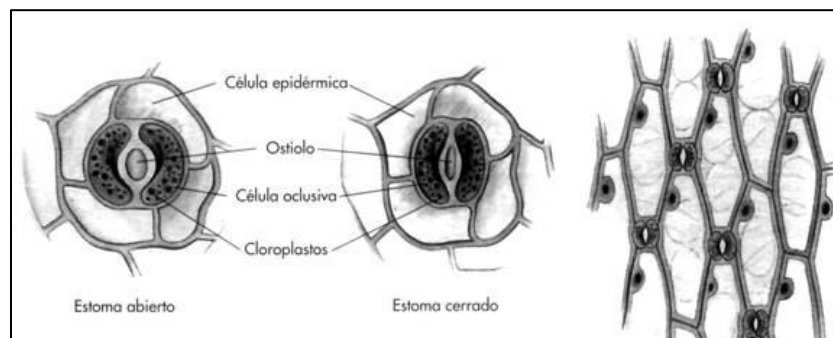


Figura 1: Esquema de estomas de planta de puerro, extraído de de Agrios 1997

2.2.2. Defensa bioquímica pre-existente

Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios se pueden dividir en tres grandes grupos:

1. Terpenos
2. Compuestos fenólicos
3. Compuestos Nitrogenados

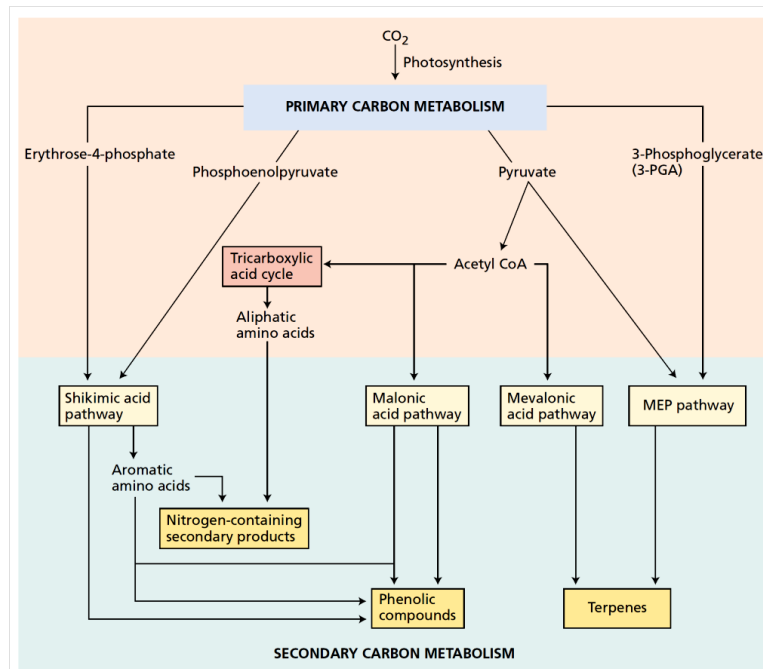


Figura 2: Esquema de los principales metabolitos secundarios y sus principales precursores extraído de Taiz 2005.

Terpenos

Los terpenos constituyen la mayor clase de metabolitos secundarios. Son generalmente insolubles en agua a pH fisiológico y son sintetizados a partir de Acetil-CoA o compuestos intermediarios de la glucólisis. La unidad básica estructural de los terpenos es conocida como unidades isopreno.

Los terpenos son clasificados por el número de unidades de cinco carbonos que estas poseen. Algunos terpenos tienen un rol fitohormonal como las Giberelinas que son esencialmente un diterpeno y el ácido abscísico derivado de carotenoides. Los carotenoides que dan lugar a tejidos con coloraciones rojas, amarillas y anaranjadas son teraterpenos que funcionan como pigmentos

accesorios en la fotosíntesis y protegen los tejidos fotosintéticos de la fotooxidación. Dentro de los terpenos se pueden distinguir dos clases:

- I) Terpenoides; compuestos con elementos adicionales, usualmente oxígeno, son llamados terpenoides o aceites esenciales. Los terpenoides muestran un origen similar al de los ácidos grasos a diferencia de que contienen extensas ramificaciones y son cíclicos. Ejemplos comunes de terpenoides son el camfor (monoterpenos), farnesol y artemisina (sesquiterpenos). Los terpenoides son activos contra insectos, bacterias, hongos, virus y protozoarios. Ya en 1977, se reportó que el 60% de los aceites esenciales examinados hasta la fecha presentaban actividad inhibitoria frente a hongos, mientras que el 30% presentaba actividad antibacteriana (Cowan *et al.*, 1999).
- II) Saponinas; son esteroides y triterpenos glicosilados con propiedades anfipáticas. Todos los compuestos aislados muestran en mayor o menor grado, actividad antimicótica. Estos reportes involucran principalmente a miembros de la familia Solanaceae donde el aislamiento de una saponina provenientes de *Capsicum frutescens L. (Solanaceae)*, CAY-1 mostró tener actividad frente a 16 aislamientos fúngicos, incluidos *Candida spp.*, *Aspergillus fumigatus*, y especialmente activo frente a *Cryptococcus neoformans*. La importancia de CAY-1 radica en el modo de acción, ya que produce la disrupción de la integridad de las células fúngicas (Campos-Olivas *et al.*, 1995; Lacadena *et al.*, 1995; Broekaert *et al.*, 1997; Cowan *et al.*, 1999; Giordani *et al.*, 2004).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos abarcan un grupo químicamente heterogéneo con cerca de 10000 compuestos. Algunos son solubles en agua, otros en solventes orgánicos. Hay muchas funciones relacionadas a los compuestos fenólicos ya sea desde estructurales como en el caso de la lignina, hasta la generación de compuestos con actividad antimicrobiana (Taiz *et al.*, 2005). Dentro de los compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana se han reportado polifenoles, quinonas, chalconas, flavonas, flavonoides, taninos y cumarinas (Cowan *et al.*, 1999). En los últimos años, un amplio número de estudios se han realizado para determinar la actividad antifúngica de compuestos fenólicos de origen natural. Algunos de estos compuestos fueron aislados mediante fraccionamiento bioguiado (Abad *et al.*, 2007). Tres nuevos compuestos fenólicos fueron aislados de hojas de *Baseonema acuminatum P. Choux (Asclepiadaceae)*. Los compuestos mostraron actividad antifúngica frente a dos aislamientos clínicos de *Candida albicans* con valores de MIC en

el rango de 25-100 µg/mL (De Leo *et al.*, 2004). Cuatro derivados fenólicos fueron aislados a partir de las raíces de *Lycium chinense Miller* (Solanaceae), mediante la extracción con acetato de etilo. Todos presentaron actividad antifúngica e impidieron la transición a dimorfita del patógeno *Candida albicans* (Lee *et al.*, 2004). Los mecanismos responsables de la toxicidad fenólica para los microorganismos incluyen la inhibición de enzimas por los compuestos oxidados, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilos o mediante interacciones no específicas con las proteínas (Taiz *et al.*, 2005)

Alcaloides

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos de nitrógeno (Cowan *et al.*, 1999). Múltiples reportes de alcaloides de especies medicinales se encuentran en la literatura. Algunas de esas plantas han sido reportadas por ser usadas en medicina natural como agentes anti-infecciosos (Abad *et al.*, 2007).

Los alcaloides diterpenoides, generalmente aislados de plantas de la familia Ranunculaceae, presentan propiedades antimicrobianas (Atta-ur-Rahman *et al.*, 1995). Aunque se han encontrado efectos microbicidas en los alcaloides, el principal efecto es antidiarreico. La berberina es un importante representante de este grupo (Cowan *et al.*, 1999). Es potencialmente efectiva contra tripanosoma y plasmodio (Omulkoli *et al.*, 1997). El mecanismo de acción de los alcaloides aromáticos y planos, tales como la berberina, es atribuido a su capacidad de intercalarse en el DNA (Phillipson *et al.*, 1987).

2.2.3. Reconocimiento de patógenos

Se han establecido dos estrategias de reconocimiento por parte de la planta. Cada célula de la planta es capaz de detectar la presencia de moléculas extrañas y ajenas a ella. Y por otro lado cada célula es capaz de detectar cualquier cambio en alguna de sus propias moléculas. La gran mayoría de los microorganismos patógenos son no invasivos permaneciendo en el exterior de las superficies vegetales, sin que causen ningún tipo de infección. Bajo condiciones ambientales adecuadas, estos microorganismos alcanzan las partes internas de la planta a través de entradas naturales o a través de zonas dañadas; alcanzando de esta forma los espacios intercelulares de la planta, en los que pretenden sobrevivir y multiplicarse (Gómez 2005).

Reconocimiento de Patrones Moleculares de Agentes Patógenos/Microbianos.

La inmunidad innata de la planta se basa en la rápida discriminación de moléculas propias de las moléculas foráneas, la cual al igual que en animales es logrado por receptores de reconocimiento de patrones anclados a la membrana (RRP). Estos receptores se encargan de monitorear patrones moleculares asociados a patógenos/microbios conocidos como MAMP/PAMP (por sus siglas del inglés *Microbe/Pathogen-Associated Molecular Patterns*), uniéndose directamente a ellos o por asociación con proteínas de unión a PAMP. Los RRP de plantas bien caracterizados como el receptor de flagelina FLS2 y el receptor del factor de elongación bacteriano EF-Tu llamado EFR son receptores tipo quinasa con motivos de repeticiones ricas en leucina (RRL) (Panstruga *et al.*, 2009). Otro tipo de receptores de membrana con dominios de unión a peptidoglicano representan un grupo de proteínas de unión con la capacidad de reconocer un PAMP de hongos, la quitina. El reconocimiento de MAMPS conservados por RRP's dispara la cascada de señalización intracelular vía MAPK (por sus siglas en inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Esto desemboca en la activación de genes de defensa por reguladores transcripcionales específicos de plantas. La ejecución de una respuesta inmune incluye en parte la secreción local de proteínas relacionadas a las defensas (PR) como lo son las quitinasas, gluconasas, thioninas, lisozimas, proteínas ricas en cisteínas y proteínas ricas en glicina, entre otras. Algunos compuestos antimicrobianos pueden incluso ser translocados al espacio extracelular por miembros de los transportadores de la ATP-binding cassette. Otro mecanismo de respuesta frente a la activación por MAMPs es la generación extracelular de especies reactivas del oxígeno, tales como superóxido y peróxido de hidrógeno, mediante enzimas de membranas con actividad NADPH-oxidasa como por ejemplo RbohD (Panstruga *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006; Taiz *et al.*, 2005).

Reconocimiento de efectores

El reconocimiento del patógeno por la planta se hace a través de moléculas conocidas como efectores generales o inespecíficos (Taiz *et al.*, 2005). El reconocimiento de estos efectores generales provenientes del patógeno es la base de las respuestas de la "inmunidad innata" tanto de plantas como de animales, permitiendo reconocer y diferenciar sus propios componentes celulares de los de otros organismos. Estos M/PAMPs son reconocidos por receptores en la membrana plasmática vegetal, activando las respuestas de defensa de la planta, pero no necesariamente llevando a la resistencia. Las proteínas de resistencia (R) en planta se definen como una clase de receptores intracelulares que reconocen patrones relacionados a patógenos pero también incluyen unos pocos sensores de membrana (Dodds *et al.*, 2006). Tales proteínas R

reconocen directa o indirectamente de manera específica efectores codificados por genes de avirulencia (*avr*) patogénicos liberados durante la infección. La respuesta inmune activada por PRR o proteínas R está relacionadas con la acumulación de especies reactivas del oxígeno y la activación de genes de defensa, pero difieren en la vía por la cual ejecutan la muerte celular programada en el sitio de infección. Las proteínas R contienen comúnmente un dominio central de unión a nucleótidos (NB) y un dominio repetido rico en leucina (LRR, por sus siglas del inglés *Leucin-Rich Repeat*) carboxi-terminal (C-ter). La porción NB es parte de un gran dominio conocido como NB-ARC, presente en receptores R de plantas, tales como el APAF-1 (apoptotic regulators human apoptotic protease-activating factor 1) (Panstruga *et al.*, 2009). Estas proteínas pertenecen a la familia de NTPasa STAND (*Signal Transduction ATPase with numerous domains*) y actúan como un elemento regulatorio de la señal de transducción. La translocación de diversas proteínas R intracelulares al núcleo que es necesaria para activar una respuesta inmune, sugiere la acción de vías alternativas de señalización que guían una reprogramación transcripcional de la célula para la activación de una respuesta inmune (Rincón *et al.*, 2004; Moreno Gonçalves *et al.*, 2006).

Fitohormonas

El ácido salicílico (AS), el etileno (Et) y el ácido jasmónico (AJ) juegan un rol central en la compleja vía de señalización, regulando la resistencia local y sistémica ante la invasión de un patógeno. La interacción entre las diferentes hormonas permite a la planta generar una respuesta adecuada ante un determinado patógeno e integrar estímulos de estrés abiótico. La acumulación de AS y sus derivados es importante para la resistencia ante patógenos biotróficos que requieren de las células vegetales vivas para su reproducción. El AS es censado por el factor de transcripción NPR1 que ante cambios en el estado redox de la célula se activa y se traslada al núcleo, donde regula la expresión de genes codificantes de productos encargados de la vía de secreción de compuestos necesarios para generar una resistencia sistémica y evitar la diseminación del patógeno (Sánchez *et al.*, 2010). En cambio el AJ y sus derivados cooperan con el etileno para regular una resistencia contra el patógeno que inducirá la muerte celular de aquellas células infectadas pero no en aquellas células próximas. El antagonismo entre las respuestas mediadas por AS y AJ/Et ocurre a muchos niveles y ha sido incorporado en algunos patógenos que producen moléculas que mimetizan AJ para inhibir la activación de la vía del AS (Panstruga *et al.*, 2009). Por otro lado, otras hormonas vegetales como auxinas, ácido abscísico y citoquininas y giberelinas, que fueron

inicialmente descritas como hormonas reguladoras del crecimiento, influyen en la regulación de la respuesta inmune de las plantas (Denancé *et al.*, 2013).

2.2.4. Defensas que se activan en respuesta a las infecciones.

Aun luego de que el patógeno ha penetrado las estructuras de defensa preformadas, las plantas muestran varios grados de resistencia que consisten en activar la formación de uno o más tipos de estructuras que tienen una cierta efectividad para contrarrestar las invasiones avanzadas de los patógenos sobre ellas. Algunas de las estructuras de defensa formadas incluyen los tejidos que impiden el avance del patógeno, hacia el interior de la planta, que se les denomina **estructuras histológicas de defensa**; otras comprenden las paredes de las células invadidas y se les denomina **estructuras celulares de defensa**; todavía otras incluyen al citoplasma de las células atacadas y al proceso se le denomina **reacción de defensa citoplasmática**. Por último, la muerte de las células invadidas puede proteger a la planta de otras invasiones, por lo que se le denomina al proceso **reacción necrótica o reacciones de hipersensibilidad** (Agrios, 2005)

Estructuras histológicas de defensa

Formación de capas de corcho.

La infección que ocasionan los hongos, bacterias e incluso algunos virus y nemátodos en las plantas con frecuencia inducen la formación de varias capas de células de corcho más allá de la zona donde se ha producido la infección, aparentemente como resultado de la estimulación que ejercen las sustancias que excreta el patógeno sobre las células del hospedero. Las capas de corcho no solo inhiben las invasiones que pueda intentar el patógeno sobre otras células, sino también bloquean la difusión de cualquier sustancia que el patógeno pueda secretar. Además, estas capas detienen el flujo de agua y nutrientes desde las zonas sanas hasta la zona infectada y suprimen la nutrición del patógeno. De esta forma los tejidos muertos e incluso el patógeno quedan delimitados por las células de corcho y permanecen en ese sitio formando una lesión necrótica (mancha), o bien son expulsados hacia el exterior por los tejidos sanos subyacentes hasta formar costras que posteriormente se desprenden, liberando así al hospedero de la presencia del patógeno (Agrios, 2005).

Formación de las capas de abscisión.

Las capas de abscisión se forman sobre las hojas jóvenes y funcionales de los árboles frutales de hueso después de haber sido infectadas por cualquiera de los distintos hongos, bacterias o virus. La capa de abscisión consta de una abertura que se forma entre dos capas circulares de células foliares en torno al foco de infección. Después de que ésta se ha producido, la lamina media localizada entre esas dos capas de células se disuelve a lo largo del grosor de la hoja, separando por completo la zona central del resto de la hoja. Gradualmente, esta zona se seca, muere y desprende, llevándose consigo al patógeno. De esta forma, la planta, al deshacerse de esa zona infectada junto con unas cuantas células todavía sanas, impide que el resto de los tejidos de la hoja sean invadidos por el patógeno o que sean afectados por sus secreciones tóxicas (Agrios, 2005).

Formación de tilosis.

Las tilosis se forman en los vasos xilémicos de la mayoría de las plantas que se encuentran bajo condiciones ambientales adversas y durante la invasión que llevan a cabo la mayoría de los patógenos vasculares. La tilosis son crecimientos excesivos del protoplasto de las células parenquimatosas adyacentes, los cuales se proyectan hacia los vasos xilémicos a través de puntuaciones. Las tilosis presentan paredes celulósicas u pueden, debido a su tamaño y abundancia, obstruir completamente a los vasos. En algunas variedades de plantas, las tilosis se forman rápida y abruptamente frente al patógeno (en tanto éste se encuentre en las raíces jóvenes), bloqueando su avance y por lo tanto, permitiendo que las plantas permanezcan libres y sean resistentes a ese patógeno. Las variedades vegetales que forman pocas tilosis o ninguna frente al patógeno son siempre susceptibles las enfermedades (Agrios, 2005).

Deposito de sustancias gomosas

Muchas plantas después de haber sufrido daños o haber sido infectadas por algún patógeno, producen varios tipos de gomas alrededor de las lesiones. La secreción de gomas es un fenómeno bastante común en los frutales de hueso, pero también se produce en la mayoría de las plantas. La función defensiva que desempeñan las gomas se debe al hecho de que se depositan con gran rapidez en los espacios intercelulares y dentro de las células que rodean el sitio de la infección, formando así una barrera impenetrable que encierra por completo al patógeno. De esta forma, el patógeno queda aislado, carece de nutrientes y muere tarde o temprano (Agrios, 2005).

Reacción de defensa citoplasmática

En algunos casos de hongos poco patógenos y de crecimiento lento que inducen enfermedades crónicas o condiciones casi simbióticas, el citoplasma de las células envuelve a los grupos de hifas y el núcleo se extiende hasta el punto donde se divide en dos partes. En algunas células invadidas, la reacción citoplásmica es anulada y su protoplasto desaparece en tanto aumenta el desarrollo del hongo. Sin embargo, en algunas de las células invadidas el citoplasma y el núcleo se agrandan. En estos casos, el citoplasma se hace granular y denso, y varias partículas o estructuras aparecen en él. Por último, el micelio del patógeno se desintegra y cesa su propagación (Agrios, 2005).

Reacción de defensa necrótica: defensa mediante hipersensibilidad.

En la mayoría de las relaciones que se establecen entre el hospedero y el patógeno, este último puede llegar a penetrar la pared celular, pero tan pronto como entra en contacto con el protoplasto de la célula, el núcleo se desplaza hacia él y en poco tiempo se desintegra y aparecen en el citoplasma gránulos pardos y en forma de resina, primero en torno al patógeno y después por todo el citoplasma. Mientras avanza de la decoloración del citoplasma de la célula vegetal y se produce la muerte, las hifas del hongo se empiezan a degenerar. En la mayoría de los casos, las hifas no se desarrollan fuera de las células vegetales, por lo que cesa la invasión de esas hifas. El tipo de defensa necrótico o hipersensible es bastante común, particularmente en las enfermedades que ocasionan los virus, nemátodos y hongos parásitos obligados. Al parecer, los tejidos necróticos aíslan al parásito obligado de las sustancias vivas (de las que depende por completo para nutrirse, crecer y propagarse), lo cual conduce a su inanición y muerte. Es probable que cuanto más rápido mueran las células del hospedero después de haber sido infectadas, se haga más resistente a esa infección (Agrios, 2005).

Péptidos y proteínas

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)

Los péptido antimicrobianos PAMs forman parte de los mecanismos de defensa conservado a lo largo de la evolución y presentes en organismos de muy distinta escala filogenética, desde procariotas hasta animales y plantas superiores (Andrew *et al.*, 1998; Zasloff *et al.*, 2002; Brogden *et al.*, 2005). Son proteínas de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana en un amplio

espectro de organismos incluyendo bacterias, hongos, virus y plantas parásitas (Izadpanah *et al.*, 2005; Zélicourt *et al.*, 2007). Los PAMs son un grupo amplio que se definen clásicamente como pequeños péptidos, contienen generalmente de 15 a 50 residuos de aminoácidos, en su gran mayoría son catiónicos a pH fisiológico (debido a la presencia de residuos de arginina y lisina) y anfipáticos; en otras palabras, contienen regiones hidrofóbicas que interactúan preferentemente con lípidos u otras macromoléculas hidrofóbicas y regiones hidrofílicas cargadas positivamente que interactúan preferencialmente con agua o con superficies cargadas negativamente. Presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro, bacterias gram positivas y gram negativas, micobacterias, hongos, levaduras, protozoos, virus e incluso células tumorales. Se pueden subdividir a su vez en diversos subgrupos en función de su origen, composición aminoacídica y estructura (Brogden *et al.*, 2005; Larrañaga *et al.*, 2012; Zélicourt *et al.*, 2007).

Estructuralmente los PAMs pueden dividirse en tres grupos claramente definidos. Un primer grupo está compuesto por péptidos lineales catiónicos que carecen de residuos de cisteína y poseen estructuras secundarias en α -hélice. Pertenecen a este grupo la melitina y cecropinas de insectos, magaininas y buforinas de anfibios, o la LL-37 de humanos (Tossi *et al.*, 2000). El segundo grupo contiene péptidos catiónicos enriquecidos en aminoácidos específicos. Carecen también de residuos de cisteína por lo que generalmente adoptan una estructura lineal, aunque no tan definida como los anteriores. En este grupo se encuentra el péptido indolicidina de animales, el cual es un péptido catiónico enriquecido en residuos de triptófano (Chan *et al.*, 2006), o las histatinas, enriquecidos en residuos de histidina (De Smet *et al.*, 2005). El tercer grupo lo forman aquellos péptidos que contienen cisteínas en su estructura primaria y que por lo tanto son capaces de formar puentes disulfuro y estructuras en lámina- β estables. Este grupo se suele subdividir a su vez en subgrupos en función del número de puentes disulfuro que posean, uno, dos, tres, o más de tres. La alta presencia de residuos de cisteínas (6 a 8 residuos) que forman puentes disulfuro, hace que sus propiedades físicas, que incluyen la resistencia a la degradación térmica y enzimática, le otorguen a la molécula gran estabilidad. Un ejemplo de este grupo son las defensinas de animales, plantas e insectos (Ganz, 2004; Virens *et al.*, 2014), o el péptido plectasina aislado del hongo saprofito *Pseudoplectania nigrella* (Mygind *et al.*, 2005), y son la clase emparentada con las proteínas antimicrobianas vegetales, las defensinas, tioninas o LTP. Dentro de este grupo, hay que mencionar el aislamiento y caracterización de pequeñas proteínas ricas en cisteína y puentes disulfuro, de carácter básico y con propiedades antimicrobianas, a partir de ciertos hongos de los

géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* (Nakaya *et al.*, 1990; Gun Lee *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 2000; Zelicourt *et al.*, 2007).

En cuanto a la actividad antimicrobiana, esta puede ser debida a la permeabilización de la membrana mediante la atracción electrostática con blancos presentes en la membrana celular de los microorganismos, interferencia en los procesos metabólicos o actuando sobre componentes citoplasmáticos específicos (Ganz, 2003). También se han descrito propiedades quimiotácticas, que le permiten modular el sistema inmune y de esta forma constituir un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Recientemente O Mello y colaboradores reportan el esfingolipido glucosilceramida como blanco de una defensina extraída de la planta *Phaseolus vulgaris* L. (O Mello *et al.*, 2014).

La gran cantidad de PAMs reportados ha motivado distintos intentos de sistematización en forma de bases de datos de acceso público, como son "*Antimicrobial Sequences Database*" (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/amsdb.html>), "*Antimicrobial Peptide Database*" (<http://aps.unmc.edu/AP/main.html>). Estos recursos están orientados a describir péptidos naturales y sus derivados de interés biomédico, proporcionando herramientas de búsqueda, visualización de estructuras secundarias, o desarrollo de nuevas secuencias antimicrobianas.

2.3. Utilización de extractos de plantas como controladores biológicos

Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas. En la actualidad los utilización de extractos naturales de plantas es una industria que crece cada vez más debido a diversas razones relacionadas con mecanismos de control de patógenos y la aparición de cepas resistentes a los compuestos de síntesis química empleados en los tratamientos de control (Domingo *et al.*, 2003). Potencialmente todas las plantas serian candidatos como fuentes de componentes antimicrobianos. En cuanto a las propiedades antimicrobianas, estas se atribuyen fundamentalmente a algunos metabolitos secundarios producidos de rutas bioquímicas que no necesariamente están relacionadas con acción de defensa. Existe una extensa bibliografía de las diferentes soluciones amortiguadoras ("*Buffers*"), empleadas para la extracción de determinados compuestos con actividad antimicrobiana, según sus propiedades moleculares, sin recurrir a pasos

exhaustivos de purificación. Un ejemplo es la utilización de *buffers* a base de éter para la obtención de alcaloides, cumarinas y terpenoides entre otros, o la utilización de *buffers* acuosos para la obtención de saponinas, polipéptidos y lectinas (Cowan *et al.*, 1999; Upadhyay *et al.*, 2014; Campos-Olivas *et al.*, 1995; Lacadena *et al.*, 1995; Broekaert *et al.*, 1997; Giordani *et al.*, 2004; Jasicka-Misiaka *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2005; D'Auria *et al.*, 2005; Angioni *et al.*, 2006; Abad *et al.*, 2007; Davicino *et al.*, 2007).

2.4. Patógenos seleccionados para ser empleados en los ensayos de inhibición utilizando extractos proteicos.

Los patógenos fueron seleccionados según su relevancia en la incidencia de la producción agrícola nacional. *Pseudomonas syringae*, *Fusarium oxysporum*, y *Penicillium digitatum* fueron los patógenos seleccionados para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos. *Pseudomonas syringae* es el microorganismo responsable del deterioro de la aparición de manchas bacterianas en frutos tales como peras, manzanas y tomates causando una disminución en la calidad del producto final (Agrios, 2005). Por otro lado dos de los cultivos de importancia agronómica en Uruguay afectados por el género *Fusarium spp.* son el trigo y el maíz. Por último, a nivel nacional, las pérdidas de cítricos en post-cosecha causadas por hongos del género *Penicillium spp* también constituyen uno de los principales problemas en la cadena agroalimentaria. Por ejemplo, la cadena citrícola es un rubro netamente exportador (122.000 ton; 50% de la producción total), alcanzando volúmenes de 70.000.000 U\$S al año (3% el valor bruto de producción del Sector Agropecuario). El 95% de la fruta que exporta se destina al mercado europeo, uno de los más exigentes en cuanto a calidad. Se estima una pérdida anual debido a enfermedades de post-cosecha por encima del 8% del volumen de exportación (Programa Nacional de Citrus-INIA).

3. Objetivo

Diseñar un método de purificación efectivo para la obtención de fracciones enriquecidas de péptidos con actividad antimicrobiana frente a patógenos de interés agropecuario: *Fusarium spp*, *Penicillium spp* y *Pseudomonas spp*.

3.1. Objetivos específicos:

- 1) Obtención de extractos vegetales.
- 2) Ensayo de actividad.
- 3) Caracterización de aquellas fracciones que presenten actividad:
 - I. Determinación de parámetros cuantificables de inhibición.
 - II. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones proteicas de interés.

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal

Semillas de diferentes especies vegetales fueron obtenidas por cortesía de Ing.Agr. Beatriz Vignale profesor adjunto de Estación Experimental de Facultad de Agronomía en Salto, Juan Rosas investigador asistente de INIA Treinta y Tres, Rafael Reyno Investigador Adjunto Fitomejoramiento INIA Tacuarembó e Ing.Agr. Roberto Zoppolo director de programa de investigación en INIA las Brujas. En la siguiente Tabla se indican las semillas que se utilizaron para llevar a cabo dicho trabajo.

Tabla 2: Semillas de especies vegetales utilizadas

	Nombre científico	Nombre común
1	<i>Adesmia Bicolor</i>	Adesmia
2	<i>Anethum graveolens</i>	Eneldo
3	<i>Coriandrum sativum.</i>	Coriando
4	<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga
5	<i>Hexachlamis edulis</i>	Ubajay
6	<i>Ornithopus pinnatus.</i>	Ornithopus
7	<i>Oryza sativa</i>	Arroz negro
8	<i>Paspalum notatum</i>	Paspalum
9	<i>Psidium cattleianum Sab</i>	Arazá
10	<i>Trifolium resupinatum</i>	Trébol 1
11	<i>Trifolium vesiculosum</i>	Trébol 2

En el laboratorio las semillas fueron desinfectadas siguiendo el siguiente protocolo: se sumergen en solución de NaClO (hipoclorito de sodio) al 5% por 10 minutos, se lavan con agua mQ, posteriormente se tratan con alcohol etílico al 70% y finalmente se lavan con agua mQ. Todo el tratamiento se realiza en cámara de flujo laminar hasta la obtención de las semillas secas. Por último las semillas se guardan a -20°C en tubos falcon estériles (Maeso *et al.*, 2012).

4.2. Extracción proteica

Todo el procesamiento de las muestras fue realizado teniendo la precaución de preservar la actividad de posibles péptidos/proteínas antimicrobianas de manera de minimizar sus pérdidas por proteasas y degradación física. Las muestras para ello fueron conservadas a baja temperatura o en escamas de hielo, excepto expresado específicamente. Primero se trabajaron las semillas para la obtención de harina, usando N_2 (l) para evitar la degradación mediante la acción de proteasas de la muestra durante la molienda para lo cual se empleó una procesadora de 250 W hasta obtener una harina lo más fina posible. Una vez obtenida la harina, la misma se mezcló (en relación 1:5) con buffer de extracción (NaCl 0,6M: HCl 1%, y 1 ml de pepstatina A 1,25mg/mL) (Pelegri, 2006). Se varió el tiempo de reposo (2hs, 4hs, toda la noche) con el fin de determinar el tiempo óptimo de extracción a 0 °C. Se clarificó la solución utilizando filtrado con 8 capas de gasa en filtro *Buchner* 9,6 con bomba de vacío, seguido de varios pasos repetidos de centrifugación a 7000 rpm por 30 minutos a 4°C para lograr clarificar la muestra y finalmente filtrado en filtros de papel de Wattman con bomba de vacío. A este extracto proteico inicial se lo rotuló como “*Extracto crudo*” (EC) y se guardó una alícuota de 5 ml a 4°C que sería retomada posteriormente en los pasos de diálisis.

4.3. Precipitación proteica

Para este trabajo se escogió la técnica de separación proteica por precipitación con solvente orgánico. Para la precipitación se empleó acetona en dos etapas con el fin lograr hacer una precipitación de proteínas en función del peso molecular. Una vez que se logró clarificar la muestra se prosiguió a la precipitación con solvente orgánico. Debido a la naturaleza desnaturizante del solvente, la precipitación se llevó a cabo agregando acetona previamente enfriada a -20°C. La primera etapa consistió en agregar un volumen (50%) de acetona con el fin de precipitar mayoritariamente las proteínas de alto peso molecular y luego hacer una segunda precipitación con seis volúmenes de acetona (92%) para lograr precipitar principalmente las proteínas de bajo peso molecular y péptidos (Scopes 1994). La mezcla de acetona-extracto crudo (1:1) se colocó en agitación a 0°C durante cuatro horas para luego ser centrifugada a 10600 x g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un vaso de bohemia acorde al volumen

trabajado ya que sobre el mismo se realizó el segundo paso de precipitación. El pellet fue tratado en baño de hielo durante 30 minutos en cámara de flujo con el fin de eliminar el resto de sobrenadante que pudiera haber quedado. Luego el precipitado fue resuspendido en el menor volumen de agua mQ posible, rotulado como *pellet un volumen* (denominado extracto 1V) y guardado a -20°C.

La segunda etapa de precipitación se realizó sobre el sobrenadante recuperado de la ronda anterior, adicionándole acetona hasta completar los seis volúmenes. Se dejó en agitación magnética toda la noche en cámara de frío a 4°C. Se centrifugó a 11500 x g por 45 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó para recuperar la acetona por destilación al vacío en *rotavapor*. El pellet se trató de la misma manera que el pellet de un volumen y se rotuló como "*pellet seis volúmenes*" (denominado extracto 6V).

4.4. Diálisis y liofilizado

Para eliminar sales y otros componentes de bajo peso molecular, todos los extractos fueron dializados por 24 hs a 8°C con cuatro cambios de agua, en membrana de diálisis (*Spectra/pro dialysis membrane*) de celulosa regenerada con un Koff de 2000 Da y contra un volumen de tres litros de H₂O calidad mQ. Posteriormente se liofilizaron a 133×10^{-3} mBar, -40°C. Los liofilizados fueron resuspendidos en el 10% del volumen inicial con agua mQ, centrifugados a 12000 rpm, filtrados por filtros de nitrocelulosa de 0,22µm y guardados -80°C. La cuantificación de las proteínas presentes en los extractos se realizó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), usando el kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, EE.UU) (Smith, 1985) y/o a través de la Absorbancia 280 nm (Scopes 1994).

4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (TRICINE-SDS-PAGE)

Para seguir el proceso de precipitación, se realizó un gel de Tricina-SDS-PAGE que ofrece separación de alta resolución de proteínas de bajo peso molecular o péptidos. Se usó el gel concentrador al 4 %, y el separador al 16% descrito por Schagger en 2006. Las muestras de extractos proteicos se mezclaron con tampón de muestra 4X (concentración final 1X), se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y se cargó 20 µL por pocillo. Se usó el marcador de peso molecular

Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Biorad Laboratories, CA, EEUU). Los geles se corrieron a un voltaje inicial de 30 V hasta que las muestras entraron en el gel separador. Posteriormente, se subió el voltaje a 125 V hasta el final de la corrida.

La tinción de proteínas se llevó a cabo mediante tinción con azul de Comassie, utilizando el protocolo descrito por Schagger 2006. Luego de finalizada la electroforesis, las proteínas se fijaron en el gel mediante incubación en solución fijadora (50 % metanol, 10 % ácido acético) durante 1 hora. Para la tinción se colocó el gel en solución de tinción de Coomassie R-250 (0.5 % de Coomassie R-250, 10 % de ácido acético) durante 1 hora, seguido de solución para decolorar (10 % ácido acético) hasta que se pudieron visualizar las bandas (Schagger *et al.*, 2006).

4.6. Microorganismos testeados

Aislamientos de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Fusarium oxysporum* y *Pseudomona syringae* de pera fueron cedidos Ing. Agr. Ph.D. Carolina Leoni del Departamento de Protección Vegetal del instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Las Brujas). Los aislamientos de *Penicillium digitatum* fueron cedidos por Ing. Agr. Ph.D. Elena Pérez del departamento de Fitopatología de INIA estación Salto Grande.

Para preparar el stock de hongos se realizó un cultivo primario en *potato dextrosa agar* (PDA) 5% a 24°C, de cual se extrajeron esporas, las cuales fueron alicuotadas y conservadas en glicerol 40% a -80°C para su posterior utilización. Para obtener esporas se siguió el protocolo descrito por Broekaert *et al.*, 1990. Luego de cuatro días de crecimiento de una alícuota de stock en PDA se agregaron 5ml de agua mQ estéril, se rastrilló la superficie de manera de extraer la mayor cantidad de esporas posible, y posteriormente se filtró el homogenizado mediante capas de gasa estéril en falcon de 15ml. Las esporas fueron separadas por centrifugación del filtrado a 7000 rpm por 20 minutos a 4°C. El pellet conteniendo mayoritariamente esporas se resuspendió en 2ml de agua mQ. Posteriormente se realizó el recuento de esporas utilizando cámara de *Neubauer*, y se ajustó la concentración de la suspensión de esporas a 2×10^6 esporas/ml para ser utilizadas a en los bioensayos.

Las bacterias fueron repicadas a 5 mL de medio Trypticase 2% e incubadas por 16hs a 37°C con agitación a 200 rpm. El cultivo fue alicuotado en tubos eppendorf de 500 µL y conservado en glicerol 40% a -80°C para su posterior utilización. Un día antes de realizar el ensayo, una alícuota del stock de bacterias fue pre-incubada por 16 horas a 37°C con agitación a 200 rpm en *Trypticase* 2% y luego se ajustó la concentración bacteriana utilizando la aproximación de la escala Mc Farland equivalente a 1×10^6 UFC/ml que fue utilizada para el ensayo. De todas maneras en paralelo a los bioensayos se realizó recuento en placa para corroborar la concentración.

4.7. Determinación de la actividad antimicrobiana.

4.7.1. Bioensayo de difusión en placa

Para tener una primera aproximación de la actividad antifúngica se realizó un ensayo de difusión en placa (Díaz Dellavalle, 2011) con algunas modificaciones. Sobre la placa de PDA (*Potato dextrosa Agar*) estéril se dispensaron de manera uniforme 100 µL de una suspensión con 2×10^3 esporas/mL de *F.oxysporum*. En lugar utilizar discos de papel Wattman se realizaron cinco pocillos con el fondo de un tipo de 200 µl en el medio PDA. Posteriormente se colocaron 30µL de H₂O mQ como control negativo y 30µL del fungicida comercial Captan a una concentración 0,2 mg/mL como control positivo. En cada pocillo restante se colocó una alícuota de 30 µL de extracto crudo, extracto 1V y extracto 6V, respectivamente. La placa fue incubada por 72 hs a 24°C. Se prefirió realizar esta modificación para aumentar la sensibilidad del ensayo y ensayar directamente la muestra sin interferencia con los discos de papel.

4.7.2. Determinación del porcentaje de inhibición, la mínima concentración inhibitoria (MIC) y la mínima concentración fungicida (MFC)

Aquellas muestras que presentaron actividad inhibitoria en el ensayo anterior pasaron a la evaluación en placa de 96 pocillos. La actividad antifúngica fue determinada mediante el método cuantitativo microespectrofotométrico automatizado en microplacas (Broekaert, 1990; Díaz Dellavalle et al 2011). Este método se basa en el monitoreo del crecimiento mediante la

cuantificación de la densidad óptica a una longitud de onda dada (595nm) en un lector de placas Multiskan FC de Thermo Scientific. Se hicieron diluciones seriadas al medio de los extractos a evaluar. En cada uno de los pocillos de microplaca de 96 pocillos se colocaron 50 µl de caldo papa dextrosa (PDB) con esporas a concentración final 2×10^4 esporas/ml, más 50 µl de extracto a evaluar. Se homogenizaron bien con pipeta automática y se dejó reposar por 30 minutos; transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia A_0 a 595nm. Pasadas las 48 horas de incubación a 24°C, se procedió de la misma forma y se determinó la absorbancia A_{48} a 595nm. La absorbancia corregida (A_c) se obtuvo realizando la diferencia entre las dos medidas $A_c = A_{48} - A_0$. Se utilizó agua en lugar de extracto como control negativo, siendo la absorbancia (A_b) de esta muestra fundamental para el cálculo de la Inhibición del crecimiento. Además, se usó como control positivo el fungicida comercial captan a una concentración de 0,2 mg/ml, según bibliografía (Lipkin, et al 2005). Todos los ensayos de actividad antifúngica fueron realizados por triplicado (réplicas técnicas) y a su vez se hicieron tres replicas biológicas independientes. El porcentaje de inhibición de crecimiento (%) se determinó como:

$$I\% = \left[\frac{A_c - A_b}{A_b} \right] \times 100$$

La técnica de microtitulación de Díaz 2011 con modificaciones, fue utilizada para obtener los siguientes parámetros: Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) y la Mínima Concentración Fungicida (MFC). Esta técnica consiste en hacer diluciones seriadas al medio de los extractos seleccionados para poder establecer una relación dosis-respuesta. El MIC se definió como la mínima concentración de extracto que muestra inhibición mayor al 50% en comparación al crecimiento del control. La actividad MFC fue determinada como describe Espinel-ingroff, A. *et al.*, 2002, Díaz Dellavalle en 2011. Luego de 72 horas de incubación de las microplacas, se tomaron 20 µL de los pocillos que presentan completa inhibición y se pasaron a una placa estéril de PDA y se incubaron a 24°C por 72 hs, y se determinó la mínima concentración fungicida.

5. Resultados y Discusión

Caracterización de los extractos y evaluación del potencial inhibitorio de los mismos.

Del tratamiento de las semillas se desprende que no todas las semillas se comportaron de manera similar, mostrando marcadas diferencias en la consistencia de los extractos obtenidos. Algunas semillas generaron un medio muy viscoso que prácticamente hizo imposible su evaluación por esta técnica, dos ejemplos claros fueron *Salvia hispánica* (chía) y trébol rojo. En esta última el tratamiento con un volumen de acetona generó un precipitado de aspecto gomoso y completamente insoluble en agua, mientras que el tratamiento con seis volúmenes de acetona resultó en extractos con concentraciones muy bajas de proteínas. Las semillas que no mostraron este comportamiento fueron bastante homogéneas en aspectos visuales de extracción proteica y precipitación, facilitando su manipulación y correspondiendo con el perfil observado en electroforesis.

Toda la metodología de puesta a punto de la extracción y precipitación se llevó a cabo con semillas de Arazá ya que se contaba con cantidades suficientes para la ejecución del trabajo. Se encontraron diferencias en la extracción de proteínas al variar el tiempo de incubación de la harina en buffer de extracción, resultando la máxima capacidad de extracción a las 4hs de incubación. En estas condiciones se obtuvo un valor de 36 mg de proteínas totales a partir de 15 gr de semillas de Arazá determinado por el método de BCA. Fijado el tiempo de extracción se realizó el cálculo de recuperación de proteínas considerándose como 100% la concentración de proteínas del extracto crudo (Tabla 3). Se puede observar que luego de las dos precipitaciones sucesivas se recupera un 41% de proteínas de bajo peso molecular (Figura 4), 8% en el extracto 1V y 33% en el extracto 6V. Cabe destacar que durante el proceso de precipitación y recuperación proteica se observó una porción insoluble que no se lograba resuspender y esta fue mayor durante la preparación del extracto 1V que en la fracción 6V.

Tabla 3: Recuperación de proteínas luego de precipitación con acetona utilizando semillas de Arazá.

Buffer salino Ácido	Volúmen (mL)	[Proteína] (mg/ml)	Proteínas totales (mg)	% recuperación
EC	15	2,46 ± 0,02	36.90	100%
1V	2	1,52 ± 0,03	3,03	8%
6V	2	5,89 ± 0,02	11,82	33%

En la Figura 3 se puede observar el resultado de la electroforesis que muestra el perfil de proteínas del extracto antes y después de las precipitaciones con acetona. El agregado de 1V de acetona en la mayoría de los extractos generó un precipitado mayor pero de bajo contenido proteico y casi sin proteínas de bajo peso molecular (carril C). Sin embargo en el extracto obtenido luego del tratamiento con 6V de acetona (carril D) podemos observar que se obtiene mayoritariamente proteínas de bajo peso molecular. Esta figura se muestra a modo de ejemplo ya que para el resto de los extractos se observó un perfil idéntico de precipitación (datos no mostrados).

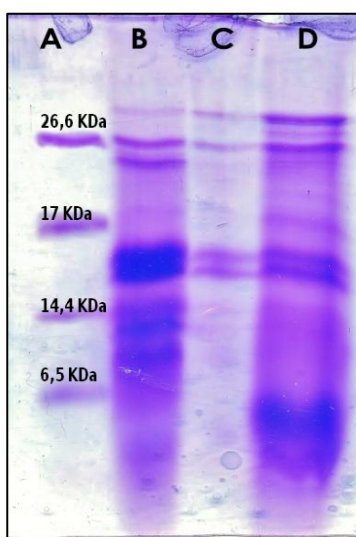


Figura 3: Electroforesis SDS-PAGE 16%-Tricina del extracto de Arazá, A- Marcador de peso molecular Péptides (Biorad). B- 40µg de extracto crudo. C. 40 µg de 1v. D- 40 µg de 6V.

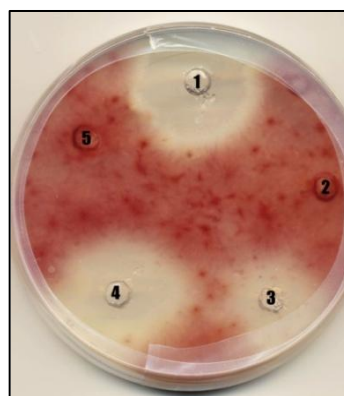


Figura 4: Ensayo de inhibición extractos de Adesmia en PDA con esporas de *F.oxysporum*, 1- Captan 0,2 mg/mL. 2- Extracto 1V a 2mg/ml. 3- Extracto crudo a 2mg/ml. 4- extracto 6V volúmenes a 2mg/ml 5- H₂O mQ

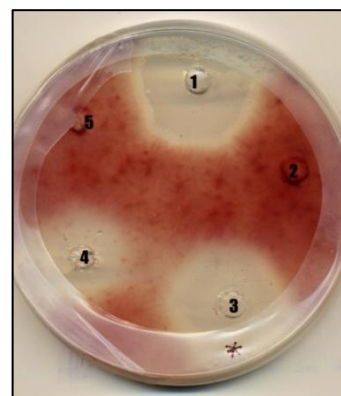


Figura 5: Ensayo de inhibición extractos de Arazá en PDA con esporas de *F.oxysporum*, 1- Captan 0,2mg/mL. 2- Extracto 1V a 2mg/ml. 3. Extracto 6V a 2mg/ml 4- extracto crudo a 2mg/ml 5 H₂O mQ

En cuanto a la evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos en el ensayo de difusión en placa de PDA se eligió *F. oxysporum* como candidato para la evaluación inicial ya que en ensayos previos mostraba ser más susceptible que otras especies de hongos trabajados *in vitro*. Se observó efecto inhibitorio, causado por extractos de algunas de las semillas evaluadas, tal como se muestra en la Figura 4 y 5 para los extractos de Arazá y Adesmia, respectivamente. Se puede ver el halo de inhibición cuando fue utilizado el extracto crudo y el extracto 6V. El control positivo de inhibición

en este caso fue el fungicida comercial Captan en concentración 0,2mg/ml. Como control negativo se utilizó agua mQ.

En las imágenes se puede observar que los *extractos crudos* de ambas semillas presentan un halo de inhibición sensiblemente mayor que los extractos de *seis volúmenes*. Dado que se colocó la misma cantidad de proteína, esto se puede atribuir a una mayor actividad antifúngica debido a la acción conjunta de diferentes moléculas presentes en las semillas, como pueden ser péptida, quitinasas, remanentes de aceites esenciales, flavonoides, antocianinas, etc. Existe una extensa bibliografía en la que reportan actividad antimicrobiana en extractos de distintos órganos de plantas (Upadhyay *et al.*, 2014; Giordani *et al.*, 2004; Jasicka-Misiaka *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2005; D'Auria *et al.*, 2005; Angioni *et al.*, 2006; Abad *et al.*, 2007; Davicino *et al.*, 2007). Muchos trabajos no analizan ni atribuyen la actividad a un solo grupo de moléculas, pero por las características fisicoquímicas de las soluciones empleadas se puede inferir la presencia de ciertas moléculas con actividad antimicrobiana. Por ejemplo los extractos etanólicos se ven enriquecidos en taninos, polifenoles, flavonoles y alcaloides, así como los extractos metanólicos están enriquecidos en terpenoides, antocianinas, saponinas y falvonas. Del mismo modo los extractos en donde se utiliza acetona favorecen un enriquecimiento de flavonoles (Cowan *et al.*, 1999). Es sabido que la solubilidad de los compuestos depende de la naturaleza de estos y la del solvente empleado así como la fuerza iónica y pH de la solución. En esta técnica se trabaja básicamente con dos soluciones, una de pH bajo y fuerza iónica alta, empleada para la extracción proteica, y la otra el agente caotrópico acetona, empleada en la precipitación proteica. Es muy probable que en el proceso de precipitación con solventes orgánicos algunos de los compuestos del EC que tengan actividad antimicrobiana presente una solubilidad mayor en acetona que en agua, permaneciendo soluble durante la precipitación proteica. Esto podría explicar la reducción parcial de la actividad del extracto 6v con respecto el EC. En este trabajo no se probó la desnaturalización proteica para abolir la actividad en aquellas fracciones de 6V activas y así atribuirle a moléculas de origen proteico. Sin embargo hay varios puntos que nos animan a pensar que las moléculas responsables de la inhibición son péptidos o proteínas de bajo peso. Por ejemplo, el buffer empleado en la extracción proteica reportado en bibliografía mencionada anteriormente, el perfil de electroforesis revelado con tinción de *coomassie* y la cuantificación proteica por el método de BCA nos animan a creer que la actividad se debe a moléculas de origen proteico.

En los ensayos de microplaca se observó que la mayoría de los extractos crudos tenían actividad inhibitoria contra al menos un microorganismo utilizado en el análisis. Muy pocos extractos 1V tales como Adesmia, Ornithopus, Ubajay y Arroz negro, presentaron actividad inhibitoria y si lo hacían era a concentraciones altas de proteínas. Sin embargo los extractos 6V de Adesmia, Arazá, Arroz negro, Ornithopus y Ubajay presentaron actividad inhibitoria frente a alguno de los microorganismos testeados a concentraciones relativamente bajas.

Realizando un gráfico de Inhibición (%) Vs [Proteínas] se puede observar la relación dosis respuesta con la desviación estándar correspondiente a tres réplicas independientes ensayadas para la mayoría de las semillas. Solo aquellas que no mostraron inhibición inicial no tienen réplicas independientes.

Como se puede observar en la Figura 6, analizando la imagen de la placa y el gráfico con los datos de inhibición obtenidos, podemos ver que sólo el extracto crudo de Pitanga mostró actividad inhibitoria frente a *F.oxysporum*. Este comportamiento se observó en varias de las semillas testeadas, incluso frente a diferentes hongos y quizás esté relacionada con otros compuestos, no de naturaleza peptídica, pero con actividad antimicrobiana.

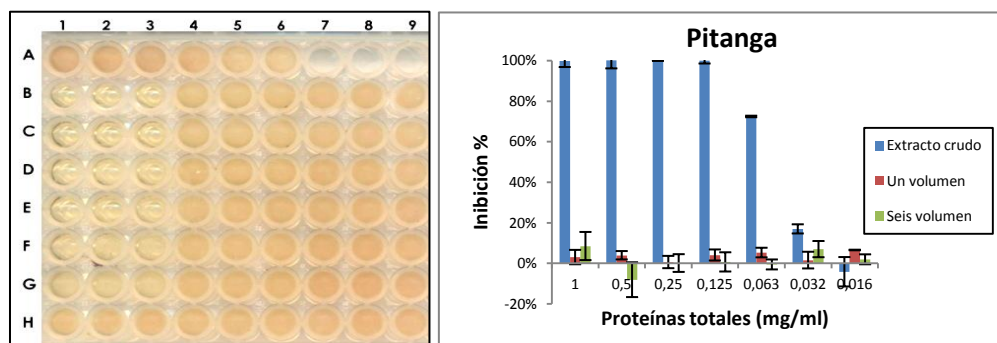


Figura 6: Izquierda ensayo para la determinación del MIC. Extractos de pitanga contra *F.oxysporum*. En pocillos A1-A6 control de crecimiento.; A7-A9 Captan 0,2mg/mL; B1-B3 Extracto crudo 1mg/mL; B4-B6 Extracto 1V a 1mg/mL. B7-B9 Extracto 6V. Pocillos de C a H diluciones al medio de la fila B. Derecha Gráfico de dosis respuesta a tiempo final 48 hs. Extractos de pitanga contra *F.oxysporum*.

Para el caso de la figura 7 y 8 donde las semillas empleadas fueron Ubajay y Arroz negro respectivamente, se puede observar que el extracto crudo presenta una fuerte inhibición. También se observa inhibición con el extracto 6V pero en menor proporción con respecto al extracto crudo. Esto también se observó para todos las semillas que presentaron actividad en el extracto 6V. En todos los ensayos la actividad del extracto 6V es menor que la del extracto crudo.

Como fue explicado anteriormente este comportamiento se podría atribuir a que el extracto crudo no tiene el tratamiento con acetona, por lo que conserva más componentes originales de las semillas. Mientras que en el caso del extracto 6V, como se puede observar en la figura 3 se recupera un bajo porcentaje de proteínas de bajo peso molecular, algunas se pierden en el tratamiento con 1V, además en el proceso de obtención del extracto 6V hay producto de la precipitación que no se logra resuspender.

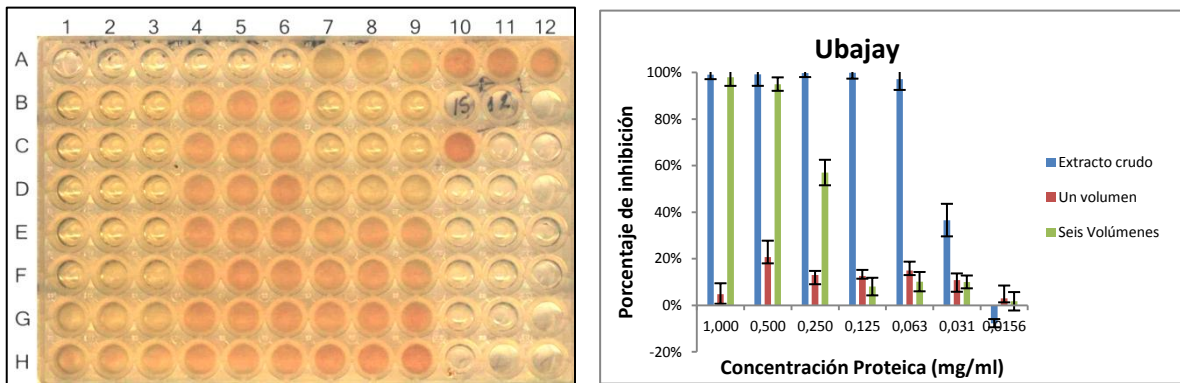


Figura 7: Izquierda ensayo para la determinación del MIC. Extractos de Ubajay contra *F.oxysporum*. En pocillos A1-A6 control de crecimiento; A7-A9 Captan 0,2mg/mL; B1-B3 Extracto crudo 1mg/mL; B4-B6 Extracto un volumen 1mg/mL. B7-B9 Extracto seis volumen 1mg/mL. Pocillos de C a H diluciones al medio del la fila B. Derecha gráfico de dosis respuesta a tiempo final 48 hs con extractos de Ubajay contra *F.oxysporum*.

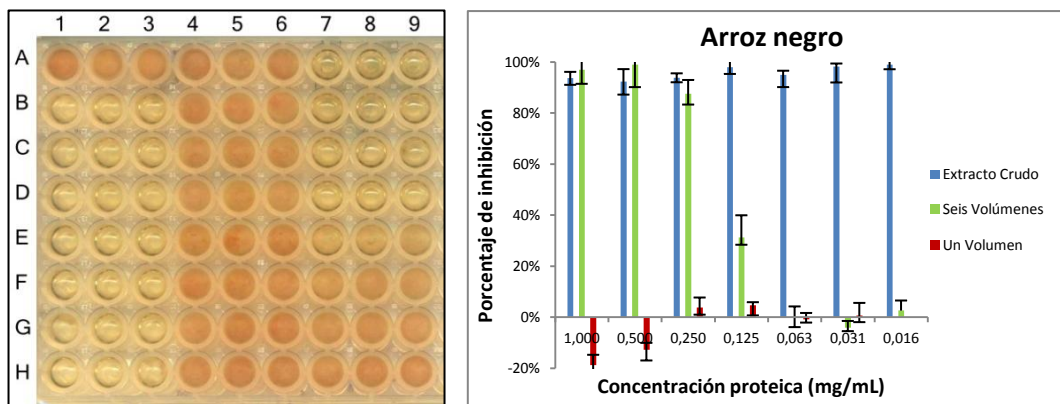


Figura 8: Izquierda ensayo para la determinación del MIC. Extractos de Arroz negro contra *F.oxysporum*.. En pocillos A1-A6 control de crecimiento.; A7-A9 Captan 0,2mg/mL; B1-B3 Extracto crudo 1mg/mL; B4-B6 Extracto un volumen 1mg/mL. B7-B9 Extracto seis volumen 1mg/mL. Pocillos de C a H diluciones al medio del la fila B. Derecha Gráfico de dosis respuesta a tiempo final 48 hs. Extractos de Arroz negro contra *F.oxysporum*

En la tabla 4 se resumen los resultados de MIC para cada semilla evaluada frente a los patógenos planteados, de donde se desprende que la las semillas que mostraron actividad inhibitoria en el extracto 6V frente a *F.oxysporum* fueron Adesmia, Arazá y Arroz negro con un MIC de 125 µg/mL y Ubajay con un MIC de 250 µg/mL. De la misma manera Adesmia, Arazá, Ormithopus, Ubajay y Arroz negro presentaron un MIC de 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 31,25 µg/mL y 125 µg/mL respectivamente contra *P. digitatum* y *P. italicum*. Por otro lado los extractos 6V de Arroz negro, Ornithopus, Pitanga y Ubajay presentamos actividad inhibitoria contra *P. syringae* con un MIC de 125 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL y 125 µg/mL respectivamente. Los valores de MIC son atractivos desde un punto de vista de aplicabilidad biotecnológica en comparación con lo reportado en bibliografía. A modo de ejemplo Hernandez Díaz en 2011, reportan MICs del orden 8 mg/mL en los extractos crudos de tres especies vegetales evaluadas utilizando agua calidad mQ para la extracción; Jabeen y colaboradores reportan MICs del orden de 20 mg/mL utilizando como buffer de extracción fosfato de potasio 10mM pH=7 en *Moringa Oleifera*; Akeel y colaboradores utilizando *buffer* citrato fostato de sodio y posterior precipitado con sulfato de amonio 80% obtienen MICs de 80-180µg/mL; Díaz Delavalle 2011 utilizan tres buffer de extracción, acuoso, salino y ácido obteniendo el mejor resultado con el ácido logrando extractos que presentan MICs de 1,25-25 µg/mL en los extractos crudos, y como señalado antes hay que tener en cuenta que durante el trabajo en ningún momento se llegó a evaluar la molécula responsable de la inhibición purificada (Hernandez Díaz *et al.*, 2001; Jabeen *et al.*, 2008; Akeel *et al.*, 2014; Díaz Delavalle *et al.*, 2011). Cabe destacar que durante este trabajo no se llegó a la purificación de la o las moléculas responsables de la inhibición y los cálculos de MIC son basados en la concentración de proteínas totales determinada por el método de BCA como se indicó anteriormente.

Tabla 4: Datos de MIC para cada semilla evaluada

	Nombre común	<i>F.oxysporum</i>			<i>P. digitatum</i>			<i>P. italicum</i>			<i>P. syringae</i>		
		Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)	Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)	Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)	Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)
1	Adesmia	31,25	1000	125	> 31,25	1000	62,5	31,25	-----	> 62,5	-----	-----	-----
2	Arazá	31,25	-----	125	62,5	-----	125	62,5	-----	< 125	-----	-----	-----
3	Arroz negro	16,25	-----	> 125	31,25	-----	125	15,65	-----	62,5	250	500	125
4	Coriando	500	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	Eneldo	-----	-----	-----	31,25	-----	-----	31,25	-----	-----	125	-----	-----
6	Ornithopus	1000	-----	1000	15,65	1000	31,25	15,65	1000	31,25	250	-----	125
7	Paspalum	1000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	Pitanga	>31,25	-----	-----	62,5	-----	-----	< 62,5	-----	-----	125	-----	62,5
9	Trebol 1	1001	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10	Trebol 2	500	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	Ubajay	16,25	-----	250	15,65	1000	31,25	>15,65	1000	>31,25	250	1000	125

Para evaluar si además de actividad inhibitoria los extractos presentaban también actividad fungicida, se realizó el ensayo para calcular MFC, como se describe en materiales y métodos. Para esto se tomaron 20 μ L de los pocillos correspondientes al extracto de seis volúmenes, que presentaron 100% de inhibición y se plaquearon en una placa de *petri* con PDA. Posteriormente se incubaron a 24°C por 48hs. En la figura 9 se muestra una placa utilizada para el ensayo de MFC de extracto 6V de Arroz negro donde se utilizaron los pocillos B8, C8 y D8 con una inhibición cercana al 100%. Se puede observar que el cuadrante que contiene el blanco creció normalmente mientras que los cuadrantes B y C no hay crecimiento. En el cuadrante D sí hay crecimiento pero muy leve a las 48 hs y no se llego a captar con foto. Esto concuerda con la actividad en los pocillos D, mostró aproximadamente un 88% de inhibición y no un 97% y 99% como fue el caso de los pocillos de las filas B y C.

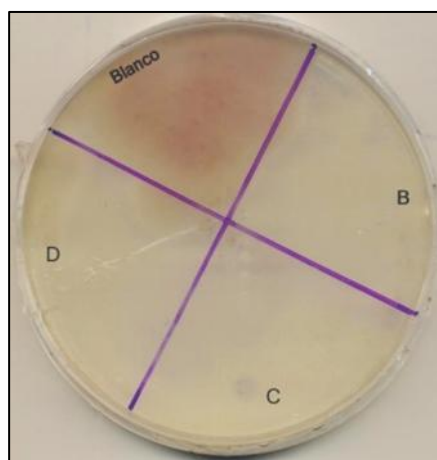


Figura 9: Ensayo de MFC para extractos de Arroz negro contra *F.oxysporum*. A-control de crecimiento; B 20 μ L de pocillos B-8; C 20 μ L de pocillos C-8; D 20 μ L de pocillo D8

En la Tabla 5 se resumen los resultados obtenidos para los ensayos de MFC donde solo se evaluaron los extractos de 6V de aquellas semillas que mostraron actividad inhibitoria en dicha fracción. Podemos observar que la mayoría de las semillas evaluadas presentaron actividad inhibitoria a excepción de Ubajay que no mostró actividad fungicida contra ninguno de los hongos testeados. Los valores de MFC para Adesmia, Arazá y Arroz negro contra *F.oxysporum* fueron de 250 μ g/mL. Del mismo modo Adesmia, Arazá y Ornithopus mostraron valores MFC de 125 μ g/mL, 250 μ g/mL y 62,5 μ g/mL contra *P. digitatum* respectivamente. Por último Adesmia, Arazá, Arroz

negro y *Ornithopus* mostraron valores MFC de 125 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, y 62,5 µg/mL respectivamente contra *P. italicum*.

Tabla 5 Valores de actividad fungicida de las semillas evaluadas

		<i>F.oxysporum.</i>	<i>P. digitatum</i>	<i>P. italicum</i>
	Nombre común	6v (µg/mL)	6v (µg/mL)	6v (µg/mL)
1	Adesmia	250	125	125
2	Arazá	250	250	250
3	Arroz negro	250	No MFC	125
4	Ornithopus	No MFC	62,5	62,5
5	Ubajay	No MFC	No MFC	No MFC

6. Conclusiones.

Se logró estandarizar un método para la obtención extractos proteicos provenientes de semillas que resultó en una metodología rápida, económica y reproducible. Del mismo modo se logró evidenciar actividad antimicrobiana en los extractos 6v enriquecidos de péptidos y proteínas de bajo peso molecular que fueron confirmados por SDS-PAGE.

Del presente trabajo se concluye que de once especies evaluadas hay cinco que presentaron una marcada actividad antimicrobiana frente a más de un patógeno evaluado. Estas son *Adesmia Bicolor* (*Adesmia*), *Hexachlamis edulis* (*Ubajay*), *Ornithopus pinnatus* (*Ornithopus*), *Oryza sativa* (*Arroz negro*), *Psidium cattleianum Sab* (*Arazá*). Los valores de MIC de los extractos 6V para las cinco especies mencionadas están comprendidos entre 0,0312 mg/mL (*Ubajay* contra *P. digitatum*) y 1mg/mL (*Ornithopus* contra *F.oxysporum*.). Considerando que estos valores se obtuvieron con una baja purificación de los extractos, se estima que con moléculas purificadas estos valores sean muy superiores y por tanto promisorios para la identificación de factores tóxicos con muy buena actividad.

Se debe destacar que los parámetros que se emplearon para la caracterización de la actividad inhibitoria permitieron discriminar la actividad diferencial de los extractos en los patógenos evaluados.

Por último en lo que respecta a la formación personal, esta experiencia sirvió para la comprensión de la planificación, ejecución de un proyecto relacionado a la investigación, así como aprender y aplicar distintas técnicas bioquímicas que son valiosas herramientas para futuros proyectos.

7. Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta tesina son parte del Componente 1 de un proyecto más general del laboratorio y permiten avanzar hacia la purificación de moléculas responsables de la inhibición en al menos cinco especies (Adesmia, Arroz negro, Arazá, Ornithopus y Ubajay) que resultaron tener actividad antimicrobiana. La metodología empleada para la identificación de inhibición en extractos buscó identificar moléculas fácilmente extraíbles en el caso del escalado de purificación. Se realizó una búsqueda bibliográfica previa a la identificación y procesamiento de especies. En las especies mencionadas se obtuvieron valores de MIC y MFC no reportados anteriormente y podría ser indicio de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. Se realizaron modificaciones en la metodología de ensayo de difusión en PDA para la evaluación de inhibición, que permitió evitar la posible interacción con los discos de papel (metodología reportada) y fundamentalmente ser más eficientes en la evaluación directa del extracto peptídico. Esta última observación es muy relevante en los procesos de evaluación de extractos, los cuales deben ser altamente sensibles, de bajo volumen, específicos y de rápida ejecución. La realización del pocillo en el medio de cultivo PDA resultó promisorio para una mayor precisión en la evaluación del analito. Para la definición de este trabajo se eligió un protocolo sencillo que puede ser mejorado y nos da pistas para futuros trabajos de purificación en las cinco especies indicadas.

8. Bibliografía

Abad, M. J., Ansuategui, M. and Bermejo, P. (2007) Active antifungal substances from natural sources. ARKIVOC (Free Journal of Organic Chemistry). VII, 116-145.

Ahmed, A. A., Bishr, M. M., El Shanawany, M. A., Attia, E. Z., Ross, S. A. and Pare, P. W. (2005) Rare trisubstituted sesquiterpenes daucanes from the wild *Daucus carota*. *Phytochemistry*. 66, 1680-1684

Agrios G.N. (2005). *Plant Pathology (Fifth Edition)*, San Diego, EEUU

Akeel R., Al-Sheikh Y., Mateen A., Syed R., Janardhan K. (2013) Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. *Saudi Journal of Biological Science*. 21, 147-151.

Andrew, D. and Rivas, L. (1998) Animal Antimicrobial Peptides: An Overview. *Biopolymers*. 47, 415-433.

Angioni, A., Barra, A., Coronco, V., Dessi, S. and Cabras, P. (2006) Chemical Composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 4364–4370.

Atta-ur-Rahman and Choudhary, M. I. (1995) Diterpenoid and steroidal alkaloids. *Natural Products Reports*. 12, 361-379.

Blanco-Labra, A. and Aguirre Mancilla, C. (2002) Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria Universidad de Guanajuato*. 12, 1-28.

Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G. W. and Osborn, R. W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Critical reviews in plant sciences*. 16, 297-323.

Broekaert, W. F., Terras, F. R. G. and Cammue, B. P. A. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibitor. FEMS Microbiology Letters 69, 55-60.

Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial Peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Rev Microb. 3, 238-250.

Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Lacadena, J., Martinez del Pozo, A., Gavilanes, J. D. and Rico, M. (1995) NMR solution structure and the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. Biochemistry. 34, 3009-3021.

Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Lacadena, J., Martinez del Pozo, A., Gavilanes, J. D. and Rico, M. (1995) NMR solution structure and the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. Biochemistry. 34, 3009-3021.

Castro, M. S. and Fontes, W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. Protein Pept. Lett. . 12, 11-16.

Chan, D. I., Prenner, E. J. and Vogel, H. J. (2006) Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 1758, 1184-1202

Cowan, M. M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS. 12, 564-582.

Cuomo, C. A., Guldener, U., Xu, J. R., Trail, F., Turgeon, B. G., Di Pietro, A., Walton, J. D., Ma, L. J., Baker, S. E. and Rep, M. (2007) The *Fusarium graminearum* Genome Reveals a Link Between Localized Polymorphism and Pathogen Specialization. Science. 317, 1400-1402.

D'Auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L. and Mazzanti, G. (2005) Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. Medical Mycology. 43, 391-396.

Davicino, R., Mattar, M. A., Casali, Y. A., Correa, S. G., Pettenati, E. M. and Micalizzi, B. (2007) Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Perú. biol.* 14, 247-251.

De Smet, K. and Contreras, R. (2005) Human Antimicrobial Peptides: Defensins, Cathelicidins and Histatins. *Biotechnology Letters.* 27, 1337-1347.

Díaz Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Dalla Rizza M (2011) Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71: 231-239

Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M., Teh, T., Wang, C.I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B., and Ellis, J.G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 8888–8893.

Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M. G. and Walsh, T. J. (2002) Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. *Journal of Clinical Microbiology.* 40, 3204-3208.

Ganz, T. (2003). The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr Comp Biol.* 43, 300-304.

Ganz, T. (2004) Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *Comptes Rendus Biologies.* 327, 539-549.

Giordani, P., Regli, J., Kaloustian, C., Mikail, L. and Abou, H. (2004) Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research.* 18, 990 - 995.

Gómez, L. (2005a) Mecanismos de detección y protección de las plantas contra las bacterias patógenas

Gonzalez Fernandez, A. (2003) Filogenia del sistema inmune. *Inmunología.* Peña, J. (ed.)

Goswami, R. S. and Kistler, H. C. (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*. 5, 515-525.

Goswami, R. S. and Kistler, H. C. (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*. 5, 515-525.

Gun Lee, D., Shin Song, Y., Kim, K. and Hahm, K. S. (1999) Antifungal mechanism of a cysteine-rich antimicrobial peptide, Ib-AMP1, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology Letters*. 21, 1047-1050.

Hao, J. J., Ye, J. Q., Yang, Q., Gong, Z. Z., Liu, W. Y. and Wang, E. D. (2000) A silent antifungal protein (AFP)-like gene lacking two introns in the mould *Trichoderma viride*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1475, 119-124.

Hernández Díaz L., Rodríguez Jorge M. (2001) Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en cuba. *Revista cubana de plantas medicinales*. (2):44-7

Jabeen R., Shahia M., JAMIL A. y Ashraf M. (2008) Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa olifera*. *Pakistan Journal of Botany*. 40(4) 1349-1358.

Jasicka-Misiaka, I., Lipoka, J., Nowakowska, E. M., Wieczorek, P. P., Młynarz, P. and Kafarska, P. (2004) Antifungal Activity of the Carrot Seed Oil and its Major Sesquiterpene Compounds. *Z. Naturforsch.* . 59, 791-796.

Kavanagh, J. A. and Wood, R. K. S. (1967) The role of wounds in the infection of oranges by *Penicillium digitatum* Sacc. *Annals of Applied Biology*. 60, 375-383.

Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Campos-Olivas, R., Vázquez, C. and Martínez-Ruiz, A. (1995) Characterization of the Antifungal Protein Secreted by the Mould *Aspergillus giganteus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 324, 273-281.

Larrañaga P, Díaz-Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Leoni C, Almeida-Souza AL, Giovanni-De-Simone S, Dalla-Rizza M (2012) Activity of Naturally Derived Antimicrobial Peptides against Filamentous Fungi Relevant for Agriculture. *Sustainable Agriculture Research*

Lee, D. G., Park, Y., Kim, M. R., Jung, H. J., Seu, Y. B., Hahm, K. S. and Woo, E. R. (2004) Anti-fungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*. *Biotechnology Letters*. 26, 1125-1130

Lipkin A, Anisimova V, Nikonorova A, Babakov A, Krause E, Bienert M, Grishin E, Egorov T (2005) An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry* 66: 2426-2431

Maeso D, Walasek W (2012) Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Agrociencia* 16: 134-142

Marcos, J. F., Muñoz, A., Pérez-Payá, E., Misra, S. and López-García, B. (2008) Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 273-301.

Mazzilli, S., Pérez, C. and Ernst, O. (2007) Fusariosis de la espiga en trigo: características de la enfermedad y posibilidades de uso de modelos de predicción para optimizar el control químico. *Agrociencia*. 11, 11-21.

Moreno Gonçalves, A. B. (2006) Aplicaciones biotecnológicas del gen *afp* (Antifungal Protein) de *Aspergillus giganteus* para la protección de plantas frente a infección por patógenos, Universidad de Barcelona

Moss MO (2002) Mycotoxin review *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist* 16: 116-119

Mygind, P., Fischer, R., Schnorr, K., Hansen, M., Sönksen, C., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgense, S., Sørensen, M., Christensen, B., Kjærulff, S., Frimodt-Møller, N., Lehrer, M., Zasloff, R. and Kristensen, H. (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*. 437, 975-980.

Mygind, P., Fischer, R., Schnorr, K., Hansen, M., Sönksen, C., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgense, S., Sørensen, M., Christensen, B., Kjærulff, S., Frimodt-Møller, N., Lehrer, M., Zasloff, R. and Kristensen, H. (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*. 437, 975-980.

Nakaya, K., Omata, K., Nakamura, Y., Kolkenbrock, H. and Ulbrich, N. (1990) Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. *European Journal of Biochemistry*. 193, 31-38.

O Mello E., Dos Santos I., O Carvalho A, Souza L., Souza-Filho² G., do Nascimento V, Machado O, Zottich U. and Gomes V. (2014). Functional expression and activity of the recombinant antifungal defensin PvD1r from *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) sedes. *BMC Biochemistry* 2014, 15:7

Oerke EC (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144: 31-43

Omulkoli, E., Khan, B. and Chhabra, S. C. (1997) Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 56, 133-137.

Omulkoli, E., Khan, B. and Chhabra, S. C. (1997) Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 56, 133-137.

Pelegrini PB, Noronha EF, Muniz MAR, Vasconcelos IM, Chiarello MD, Oliveira JTA, Franco OL (2006) An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) sedes with similarities to 2S albumin proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1764: 1141-1146

Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 77: 754-766

Phillipson, J. D. and O'neil, J. M. (1987) News leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta pharmaceutica noridca*. 1, 131-144.

Pritsch, C., Muehlbauer, G. J., Bushnell, W. R., Somers, D. A. and Vance, C. P. (2000) Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13, 159-169.

Panstruga R., Parker J., and Schulze-Lefert P. (2009). SnapShot: Plant Immune Response Pathways. *Cell* 136

Rekha. S. N and Naik. R, Prasad. 2006. Pesticide residue in organic and conventional food–risk analysis. *Chem. Health Safety* 13, 12–19.

Resolución SAGPyA Nº 201/2007. Protocolo de calidad para arandanos frescos. Versión: 08. 23 de Mayo de 2007.

Rincón Romero, A. M. (2004a) Mejora de capacidad antagonista de *Trichoderma harzianum* y de la resistencia a patógenos de *Nicotiana tabacum* mediante sobreexpresión de la β -1,3-glucanasa I, Universidad de Sevilla

Schagger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* 1: 16-22

Scopes R (1994). *Protein Purification, Principles and Practice*. Springer-Verlag, New York

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Frovenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150: 76-85

Taiz L., Zeiger E.. *Plant physiology* (five edition). Sunderland, Massachuset.

Tossi, A., Sandri, L. and Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry*. 268, 5589 - 5600.

Tuset J. J. (1987) *Podredumbres de los frutos cítricos*. Valenciana, E.G. (ed.), pp 206

Upadhyay A., Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A. and Venkitanarayanan K. (2014) Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. *Hindawi Publishing Corporation*. Volume 2014, Article ID 761741.

Vriens K., Cammue B., Thevissen K.(2014). Antifungal Plant Defensins: Mechanisms of Action and Production. *Molecules* 2014, 19, 12280-12303

Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants.

Xu, X. (2003) Effects of Environmental Conditions on the Development of Fusarium Ear Blight. *European Journal of Plant Pathology*. 103, 683-689

Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415, 389-395.

Zélicourt A., Letousey P., Thoiron S., Campion C., Simoneau P., Elmorjani K., Marion D., Simier P., Delavault P., (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanchae* parasitic plants. *Planta* 226:591–600